

Untersuchungen zur Rolle von Vaspin in der Psoriasis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Dr. rer. nat. Kathrin Rall, geb. Stabe

geboren am 27.01.1971 in Dessau

angefertigt an der

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig

Betreuer: Dr. rer. nat. habil. A. Saalbach, Professor Dr. med. J.C. Simon

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.06.2012

Bibliographische Beschreibung

Dr. Rall, Kathrin

Untersuchungen zur Rolle von Vaspin in der Psoriasis

Universität Leipzig, Dissertation

84 Seiten, 121 Literaturangaben, 25 Abbildungen, 7 Tabellen

Referat:

Die Psoriasis ist eine meist schubweise verlaufende, chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut. Sie ist genetisch determiniert und charakterisiert durch eine Dysregulation der Keratinozytenproliferation und der zellulären Immunabwehr. Patienten mit Psoriasis weisen meist noch weitere Begleiterkrankungen auf. So konnte in verschiedenen klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen Psoriasis und Adipositas hergestellt werden. Die Zellen des weißen Fettgewebes sekretieren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mediatoren (Adipokine), die Einfluss auf verschiedene metabolische Prozesse und auch Entzündungsreaktionen nehmen können. In der vorliegenden Dissertation wurde ein möglicher Einfluss des Adipokins Vaspin auf die Pathogenese der Psoriasis untersucht. Literaturbekannte Daten belegen im Tiermodell eine antiinflammatorische Wirksamkeit von Vaspin.

Obgleich der Pathomechanismus der Psoriasis bislang nicht vollständig aufgeklärt wurde, ist derzeit eine bedeutende Rolle von dendritischen Zellen unbestritten. Als antigenpräsentierende Zellen nehmen sie in der initialen Phase der Erkrankung Einfluss auf deren weiteren Verlauf. So lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darin, die Wirkung von Vaspin auf dendritische Zellen bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern und der Sekretion von Zytokinen zu untersuchen. Weitere Versuche waren darauf ausgerichtet, die Serumkonzentrationen von Vaspin in Psoriatikern mit denen einer Referenzgruppe in Abhängigkeit des BMI zu vergleichen. Darüber hinaus wurde die Expression von Vaspin auf mRNA-Ebene unter Verwendung von Hautbioptaten aus psoriatischen Läsionen und gesunden Kontrollen evaluiert. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gelang in der Immunhistochemie erstmals der Nachweis von Vaspin auf Proteinebene in histologischen Schnittpräparaten gesunder und psoriatisch veränderter Haut.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1. Definition, Klinik und Histologie der Psoriasis	1
1.2. Pathogenese und Therapie der Psoriasis	4
1.3. Psoriasis assoziierte Komorbiditäten	12
1.4. Vaspin	15
1.5. Ziel der Arbeit	17
 2. Material und Methoden	19
2.1. Spender und Probenmaterial	19
2.2. RNA Isolierung aus Hautproben	21
2.3. Reverse Transkription	22
2.4. Herstellung eines Vaspin-Standards für die quantitative real time PCR	23
2.5. DNA Gelelektrophorese	24
2.6. Photometrische Bestimmung von RNA und DNA	25
2.7. Real time PCR	25
2.8. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut	28
2.9. Gewinnung und Kultivierung von Monozyten und dendritischen Zellen	39
2.10. Kultivierung von Monozyten mit Vaspin	30
2.11. Kultivierung von unreifen DCs mit Vaspin und LPS	30
2.12. FACS-Analysen der DC Oberflächenmoleküle	31
2.13. ELISA zur Konzentrationbestimmung von Zytokinen	32
2.14. ELISA zur Bestimmung der Serumkonzentration von Vaspin	32
2.15. Datenabbildung und statistische Auswertung	32

3. Ergebnisse	33
3.1. Vergleich der Serum-Vaspinkonzentrationen von Psoriatikern und Referenzgruppe	33
3.2. Nachweis der Vaspin Expression in Hautbiopsaten	35
3.2.1. Nachweis von Vaspin mRNA mittels RT- und real time PCR	35
3.2.2. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut	37
3.3. Sequenzvergleich von Vaspin mit bekannten Protease-Inhibitoren	39
3.4. Einfluss von Vaspin auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften Von DCs	40
3.4.1. Charakterisierung der aus Monozyten generierten DCs	40
3.4.2. Einfluss von Vaspin auf die Differenzierung von Monozyten zu DCs	41
3.4.3. Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen LPS-stimulierter DCs	42
3.4.4. Einfluss von Vaspin auf die Zytokinsekretion LPS-stimulierter DCs	44
4. Diskussion	48
4.1. Vergleich der Serumkonzentration von Vaspin in Psoriatikern und Kontrollen	49
4.2. Nachweis der Vaspinexpression in Hautbiopsaten	50
4.2.1. Nachweis von Vaspin mRNA mittels RT- und real time PCR	50
4.2.2. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut und seine mögliche Rolle im gestörten Desquamationsprozess der Psoriasis ...	52
4.3. Einfluss von Vaspin auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften von DCs	61
4.3.1. Einfluss von Vaspin auf die Differenzierung von Monozyten zu DCs	62
4.3.2. Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen LPS-stimulierter DCs	62
4.3.3. Einfluss von Vaspin auf die Zytokinsekretion LPS-stimulierter DCs	64
5. Zusammenfassung der Arbeit	67
6. Literaturverzeichnis	69

Danksagung

Selbstständigkeitserklärung

Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
AMP	antimicrobial peptide
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigen presenting cell
AS	Aminosäure(n)
BMI	body mass index
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CD	Cluster of Differentiation
aCD	anti-CD
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CK	Chemokine
CLA	cutaneous lymphocyte antigen
DC-LAMP	DC- lysosomal associated membrane protein
DCs	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
dsDNA	Doppelstrang DNA
EDTA	Dinatrium-dihydrogen-ethylendiamin-tetraacetat-2hydrat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMW	high-molecular-weight
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IMiD	Immune-mediated inflammatory disease
kDa	kilo-Dalton
LB	lysogeny broth (Luria broth)
LB _{amp}	lysogeny broth (Luria broth) + Ampicillin

LFA	lymphocyte function-associated antigen
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
mAk/mAb	monoklonaler Antikörper/ monoclonal antibody
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNA
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	natural killer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OT	Objektträger
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pDCs	plasmacytoid dendritic cells
PE	Phycoerythrin
Pkt	Punkt
PSORS	psoriasis susceptibility
RCL	reactive center loop (oberflächenexponierte Domäne im Vaspin)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RPS26	ribosomal protein S26
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat (sodium dodecyl sulfate)
STABW	Standardabweichung
STAT	signal transducer and activator of transcription
SOC	SOB-Medium (super optimal broth) + 20 mM Glucose
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	very late antigen (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
WAT	white adipose tissue
ZAM	Ziege-anti-Maus

Die verwendeten Drei- und Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB- Kommission für biochemische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* 138, 9-37 (1984)].

1. Einleitung

1.1. Definition, Klinik und Histologie der Psoriasis

Die Psoriasis ist definiert als eine entzündlich hyperproliferative Erkrankung der Haut, die sich makroskopisch in Form von charakteristischen Effloreszenzen darstellt. Typisch ist eine silbrig weiße Schuppung scharf begrenzter, erythematöser Plaques. Diese genetisch determinierte chronische, meist schubweise verlaufende Hauterkrankung ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig heilbar. Nach der klinischen Erscheinungsform können Psoriasis vulgaris (mit Unterteilung in Psoriasis guttata und erythrodermatische Psoriasis), Psoriasis pustulosa und Psoriasis Arthritis unterteilt werden. Am häufigsten tritt die Psoriasis vulgaris auf mit den typischen Prädispositionsstellen Kopfhaut, Streckseiten der Arme und Beine (Ellenbogen, Knie), Sakralregion, Bauchnabel und Analfalte [MEVES, 2006] (s. Abb. 1).

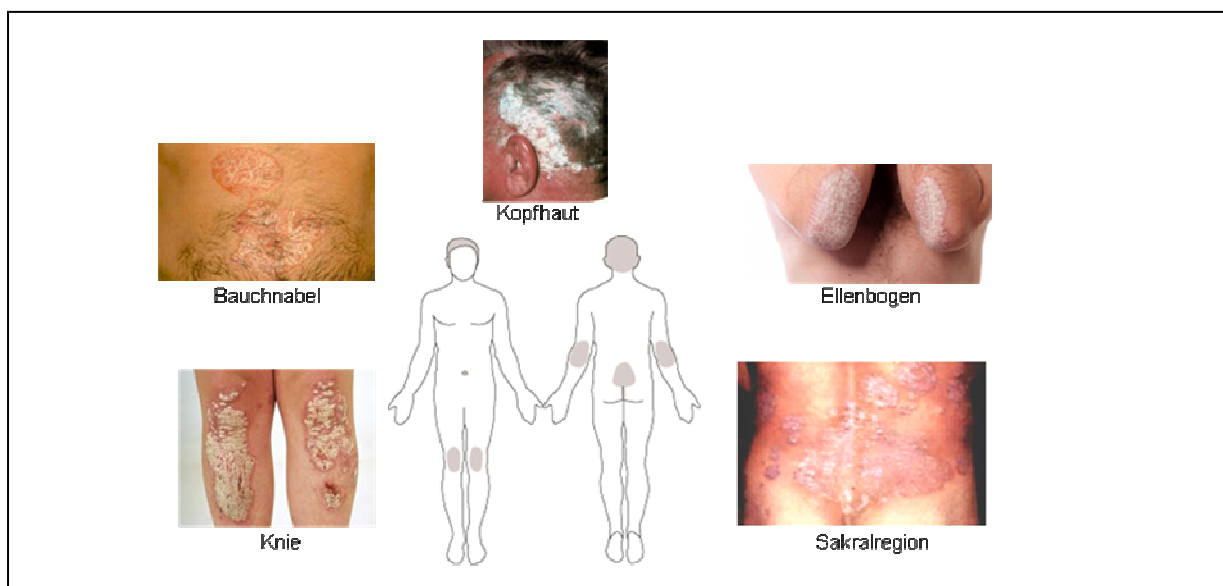


Abb. 1: Prädispositionsstellen der Psoriasis vulgaris mit klinischen Fotos.

Bildquellen: <http://www.autoimmun.ch/de/public/psoriasis-vulgaris/ber-psoriasis-vulgaris/>; <http://www.psorinfo.de/Ellenbogen-und-Knien.aspx?ID=140>; <http://www.koe88.com/leistungen/psoriasis>; <http://apps.geoinform.fhMainz.de/abschlussarbeiten/dokumente/1588/WBT/Modul1.htm>; <http://www.lifeline.de/psoriasis/krankheitsbild/erscheinungsbilder/allgemeines/content-121853.html>; http://www.skinpilot.de/Willkommen___/Uebersicht/Krankheiten/Psoriasis/psoriasis.html

Psoriasis ist hauptsächlich eine Erkrankung der weißen Bevölkerung kaukasischer Herkunft mit einer Prävalenz von 2% - 3% [MROWITZ & REICH, 2009]. Bezogen auf Deutschland sind das ca. 2 Millionen Betroffene wobei das Verhältnis Männer Frauen bei 60% zu 40% liegt [MROWITZ & REICH, 2009]. Psoriasis tritt zu etwa 40 % mit einer familiären Häufung auf, was auf eine genetische Prädisposition schließen lässt. Hier konnte ein Zusammenhang zu Merkmalen des HLA-Systems (HLA-Cw6 und -DR7)

hergestellt werden [ELDER, 2009]. Es wurden zwischen 10 und 20 Chromosomenregionen ins Auge gefasst, welche Psoriasis-assoziierte Gene beherbergen, von denen nur wenige identifiziert wurden [LOWES et al., 2007; BOWCOCK et al., 2005; LIU et al., 2006]. MHC Klasse I beherbergt den Haupt-Empfänglichkeits-Locus PSORS1, welcher in ca 10% der Psoriasisfälle präsent ist [ELDER, 2009]. Betroffene Patienten befinden sich charakteristischerweise in der zweiten bis dritten Lebensdekade und die Form der Psoriasis wird als Typ-I-Psoriasis bezeichnet. Demgegenüber weist der Typ-II-Psoriasis keine familiäre Häufung und HLA-Assoziation auf, wobei der Altersgipfel der Erstmanifestation hier in der 5. bis 6. Lebensdekade liegt [MROWITZ & REICH, 2009].

Bezüglich der Ätiologie werden verschiedene Provokationsfaktoren diskutiert. Psoriatische Hautläsionen können sich im Anschluss an eine Verletzung oder Reizung der Haut ausbilden (Köbner-Phänomen), wobei die Hautveränderungen 10-14 Tage nach dem Ereignis zu beobachten sind und typischerweise auf Patienten mit einer genetischen Prädisposition beschränkt sind. Bakterielle Infektionen, insbesondere der Kontakt mit β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A gelten als weiterer wichtiger Provokationsfaktor [EL DAROUTI & HAY, 2010]. In diesem Zusammenhang wird auch über eine mögliche autoimmune Komponente der Psoriasis diskutiert, bei der initial gebildete Streptokokken-reaktive T-Lymphozyten auf körpereigene Proteine reagieren [ELDER, 2009]. Literaturbekannte Daten räumen darüberhinaus eine ätiologische Rolle auch für Staphylokokkus aureus, Candida albicans und Pityrosporum orbiculare ein [BOEHNCKE et al., 1999]. Weiterhin können auch sogenannte Lifestyle-Faktoren wie persönlicher Stress, Rauchen, Alkoholkonsum und Depression einen Einfluss auf die Entstehung von Psoriasis haben [BOEHNCKE, 2009; EL DAROUTI & HAY, 2010]. Ein Zusammenhang mit dem Klima besteht insofern, als dass sich die Hautveränderungen bei kalter Witterung verstärken. Eine Verschlechterung der Symptome können durch einige Medikamente, wie Lithium, β -Blocker, Antimalariamittel und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) hervorgerufen werden [MEVES, 2006].

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre führten zu einer veränderten Betrachtungsweise sowohl des Krankheitskonzepts als auch der Pathogenese der Psoriasis. Dabei muss das Pathogenesemodell verschiedene Phänomene psoriatischer Hautveränderungen plausibel erklären können. Vordergründig ist eine stark gesteigerte Keratinozytenproliferation, welche Grundlage

des erhöhten epidermalen Turnovers ist. Sie bedingt eine Akanthose, Papillomatose und die intensive namensgebende Schuppung der Psoriasis. Charakteristische klinische Merkmale der Psoriasis sind das Kerzenwachsphänomen (wachsartige Schuppenspäne), das Phänomen des letzten Häutchens (glänzende Membran an der Plaque-Basis) und das Phänomen des blutigen Taus (Austreten punktförmiger Blutungen) [MEVES, 2006]. Das Stratum granulosum der Epidermis, in welchem die terminale Differenzierung der Keratinozyten beginnt, ist stark reduziert bzw. fehlt ganz in psoriatischen Läsionen. Als Konsequenz formt sich das Stratum corneum aus inkomplett differenzierten Keratinozyten, welche abnormerweise einen Zellkern enthalten (Parakeratose). Die Schuppung und die daraus folgende Unterbrechung in der protektiven Hautbarriere werden hervorgerufen durch die Unfähigkeit psoriatischer Keratinozyten (terminal differenzierte Keratinozyten) sich normal zu schichten, extrazelluläre Lipide zu sekretieren und aneinanderzuhaften. Andere typische histologische Merkmale der Psoriasis sind sogenannte Munro-Mikroabszesse (kleine Ansammlung neutrophiler Granulozyten im Stratum corneum) und signifikante mononukleäre Infiltrate in der Epidermis, welche immunhistochemisch nachzuweisen sind. Zusätzlich gibt es eine Infiltration mononukleärer Leukozyten (T-Lymphozyten und dendritische Zellen) in die Dermis und verlängerte Reteleisten. Hyperplastische Blutgefäße sind in der Papillen Region zwischen den epidermalen Reteleisten zu finden. Eine merkliche Dilatation dieser Gefäße verursacht die sichtbare Rötung psoriatischer Hautläsionen [LOWES et al., 2007]. In der Abbildung 2 sind die histologischen Merkmale psoriatisch veränderter Haut im Vergleich mit gesunder Haut dargestellt.

Die Psoriasis wird heutzutage in die Gruppe der „immune-mediated inflammatory diseases“ (IMID) eingeordnet. Für einige Jahrzehnte konzentrierte sich die Forschung der Wissenschaftler zunächst auf die Ausschaltung der epidermalen Keratinozyten-Hyperproliferation, da angenommen wurde, dass sie der Auslöser der Psoriasis ist. Ende der 1970er Jahre wurde ein neuartiges Konzept der Psoriasis-Pathogenese erstellt, in dem nun auch T-Zellen involviert waren [GUILHOU et al., 1978]. Seitdem untermauerten verschiedene Forschungsergebnisse die entscheidende Rolle der T-Lymphozyten für die Erkrankung. So implizierte die therapeutische Effizienz der Immunsuppressoren Cyclosporin und Methotrexat die Wichtigkeit des Immunsystems, insbesondere das der aktivierten T-Zellen in der Psoriasis [ELDER et al., 1993; ELLIS et al., 1986 und 1991; JEFFES et al., 1995].

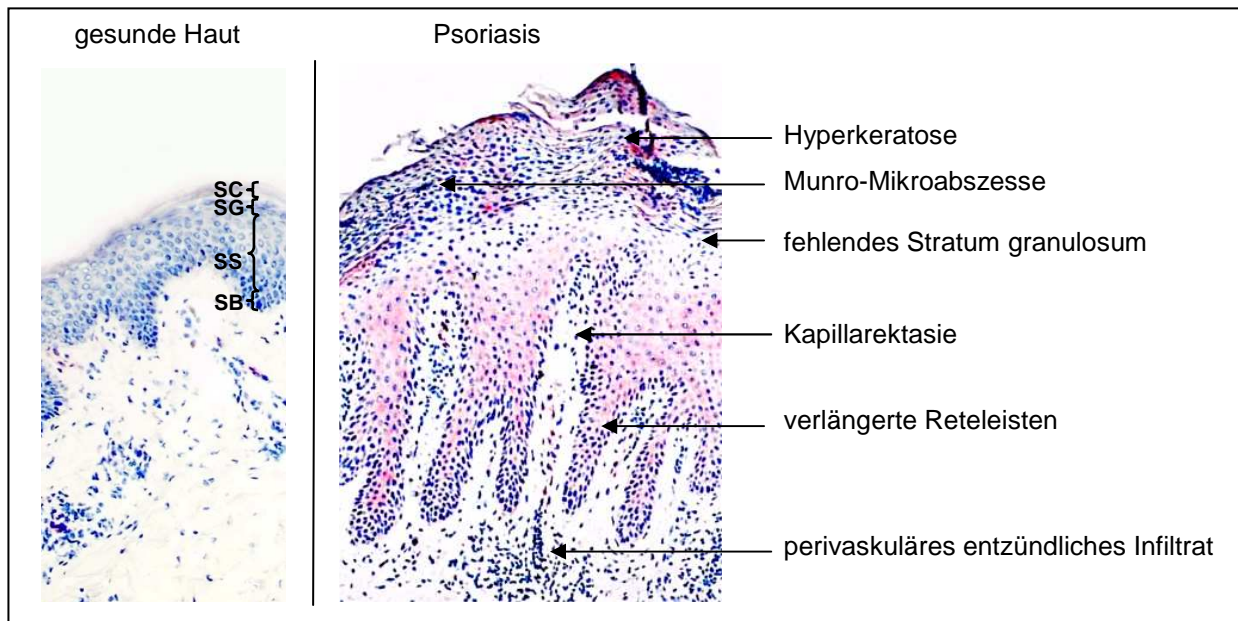


Abb. 2: Charakteristische histologische Merkmale der Psoriasis, links im Vergleich gesunde Haut. SC = Stratum corneum, SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, SB = Stratum basale

Die klinische Aktivität eines an IL-2 fusionierten Toxins (DABBLE-2), einem Agens, dass selektiv auf aktivierte T-Lymphozyten ausgerichtet ist, erbrachte bei der Behandlung von Psoriasis Patienten einen zusätzlichen soliden Anhaltspunkt, dass T-Zellen krankheitsverursachend in der Psoriasis sind [GOTTLIEB et al., 1995]. Darüber hinaus untermauerten verschiedene in vitro Studien, dass T-Zellen an der Entstehung und Chronifizierung von psoriatischen Plaques involviert sind [NICKOLOFF & WRONE-SMITH, 1999; WRONE-SMITH & NICKOLOFF, 1996]. Diese Ergebnisse führten Wissenschaftler dazu, die Rolle von Zellen des Immunsystems in der Entstehung der Psoriasis weiter zu charakterisieren und besser zu definieren.

1.2. Pathogenese und Therapie der Psoriasis

Das derzeitige Verständnis der molekularen Pathomechanismen der Psoriasis basiert auf der zentralen Bedeutung der Interaktion zwischen erworbener und angeborener Immunität. Die Pathogenese der Psoriasis ist charakterisiert durch ein komplexes Zusammenspiel von dendritischen Zellen, T-Lymphozyten, Zytokinen und nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren im Rahmen einer Typ-1-Zytokin ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, EGF, $\text{TGF}\alpha$) Immunreaktion. Während Keratinozyten in der Vergangenheit lediglich als Bystander-Zellen im Sinne der

Immunaktivierung betrachtet wurden, ist es aus heutiger Sicht mehr wahrscheinlich, dass auch sie aktive Teilnehmer im Pathogeneseprozess durch Expression zahlreicher Zytokine und nachgeschalteter Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten in psoriatischen Läsionen sind [TSCHACHLER, 2007; LOWES et al., 2007].

In der Pathogenese der Psoriasis lassen sich folgende Schlüsselereignisse benennen:

1) Antigenaufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) in der Haut; 2) die antigeninduzierte T-Zell Aktivierung durch APCs; 3) T-Zell Bindung an das Endothel des Gefäßsystems mit anschließender Migration in die Dermis bzw. Epidermis und 4) T-Zell Reaktivierung bei wiederholtem Antigenkontakt in der Dermis [Krueger, 2002].

Die Abbildung 3 zeigt einen Einblick in das Pathogenesemodell der Psoriasis, welches nachfolgend detaillierter dargestellt wird.

Als Komponente des angeborenen Immunsystems sind dendritische Zellen zur Antigenpräsentation fähig, die für eine effiziente Aktivierung von T- und B-Lymphozyten äußerst wichtig ist. Den DCs kommt nicht nur im Pathomechanismus der Psoriasis eine Schlüsselrolle zu, sondern auch bei anderen Erkrankungen mit chronischer Entzündung wie Sjögren-Syndrom, Rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematoses und Multipler Sklerose [JARIWALA, 2007]. In einem ersten Schritt erfolgt die Erkennung und Aufnahme von Antigenen durch unreife DCs in der Peripherie. Nach der Antigen-Prozessierung in Endosomen werden diese Peptide im Komplex mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche der DCs präsentiert. Währenddessen migrieren die DCs zu drainierenden Lymphknoten, was durch ein komplexes Zusammenspiel von proinflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-18), Chemokinen und Chemokinrezeptoren, Leukotrienen und Zelladhäsionsmolekülen gesteuert wird. Im sekundären Lymphgewebe findet nun die spezifische Immunantwort statt. Bei Ankunft der inzwischen gereiften DCs in den T-Zell Arealen der Lymphknoten werden die MHC-Peptid-Komplexe naiven CD4^+ -T-Helfer-Zellen und zytotoxischen CD8^+ -T-Zellen präsentiert. Die Interaktion zwischen APC und T-Lymphozyt erfolgt durch Antigen-spezifische Interaktion des T-Zell Rezeptors auf der Oberfläche von Lymphozyten mit dem MHC-Peptid-Komplex auf der DC Oberfläche, was zur Ausbildung der sogenannten immunologischen Synapse führt [GRAKOU et al., 1999], aber auch durch costimulatorische Signale wie CD80 und CD86, welche auf reifen DCs exprimiert und von CD28 (exprimiert auf T-Zellen) erkannt werden. Dabei wird die Bindung zwischen APC und T-Zelle durch Adhäsionsmoleküle wie LFA-1/ICAM-1 stabilisiert [LEBWOHL, 2003].

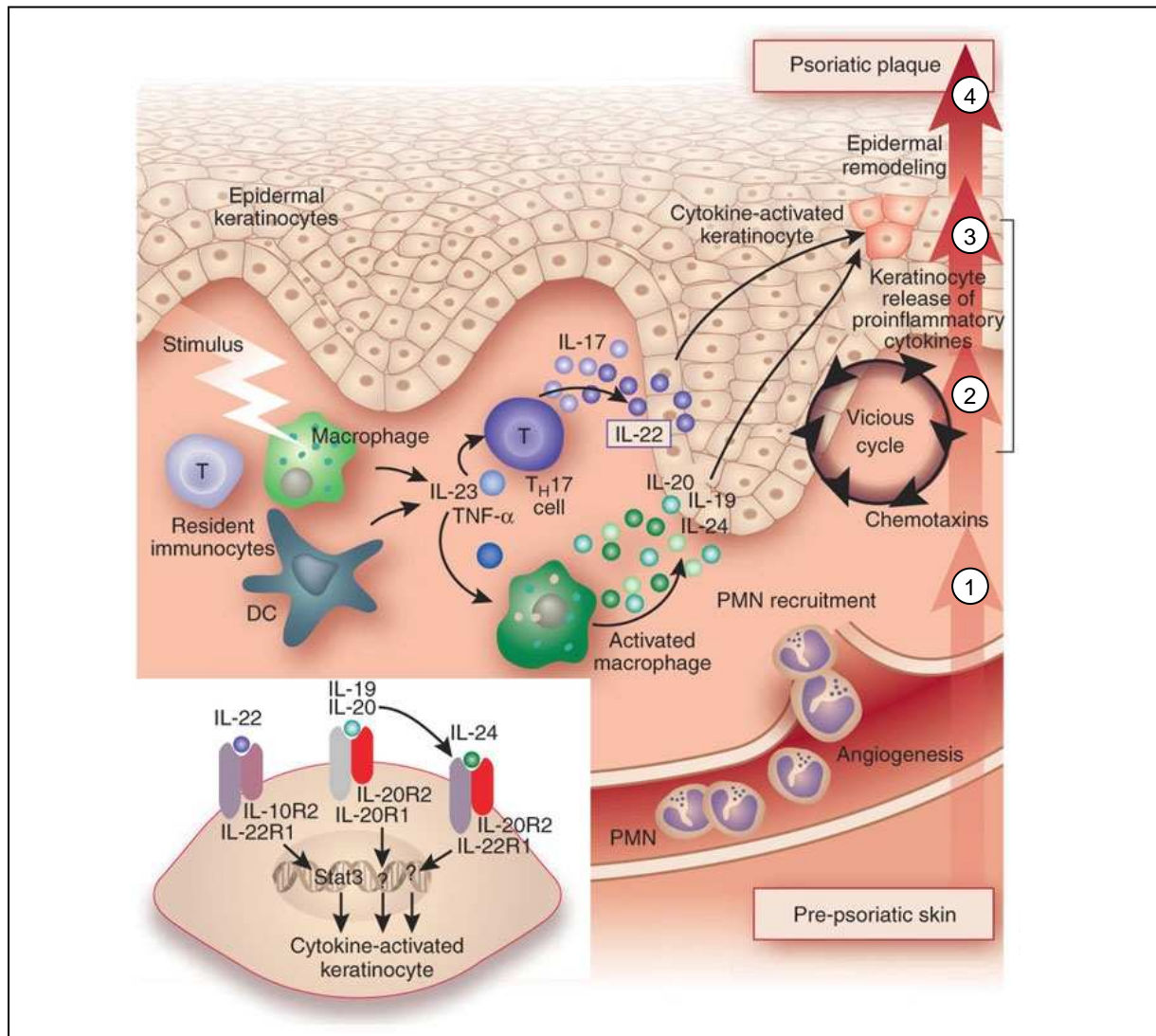


Abb. 3: Pathogenesemodell und Zytokinnetzwerk in der Psoriasis. modifiziert nach NICKOLOFF 2007a

Nach einem Stimulus (Trauma oder Infektion) produzieren ortsansässige DCs und Makrophagen IL-23 und $\text{TNF-}\alpha$. Diese Zytokine führen im Zusammenspiel mit IL-6 und $\text{TGF-}\beta$ zur Aktivierung von $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen, welche IL-17 und IL-22 freisetzen. Gleichzeitig werden IL-19, IL-20 und IL-24 von mononukleären Zellen sekretiert. Für die Keratinozyten-Hyperplasie sind die Mediatoren IL-22, $\text{TNF-}\alpha$ und IL-20R2 sowie der STAT3 Signalweg von Bedeutung.

Das Modell der Immunpathogenese der Psoriasis beinhaltet mehrere Schritte (dicke Pfeile rechts mit Zahl) wobei pre-psoriatische Haut zu einem Psoriasis-Plaques konvertiert. Die Ausbildung der Hautläsionen schließt eine Angiogenese, die Einwanderung von Neutrophilen, die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Keratinozyten-Zytokine und -Chemotaxine ein, was letztendlich zu einem circulus vitiosus der Inflammation in psoriatischen Läsionen der Haut führt. Es resultiert ein epidermaler Umbau mit veränderter Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten.

Der DC Reifungsprozess trägt zu der letztendlichen Aktivierung von naiven T-Lymphozyten und weiteren Generierung von antigenspezifischen Memory T-Zellen bei. Neben der MHC-II vermittelten AG-Präsentation wird für verschiedene Antigene wie Streptokokkenproteine eine Cross-Präsentation über MHC-I Komplexe diskutiert, die nachfolgend ein CD8^+ T-Zell-priming auslösen kann und über Störungen

regulatorischer Mechanismen zur potentiellen Selbsterhaltung psoriatischer Läsionen bei chronischer Plaque Psoriasis beiträgt [JARIWALA, 2007].

Während des Reifungsprozesses unterlaufen DCs eine große Breite an Modifizierungen wie z.B. die erhöhte Expression von costimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) und Adhäsionsmolekülen (VLA-4 und ICAM-1). Marker der DC Reifung sind weiterhin die Expression von CD83 und DC-lysosomal-assoziiertem membran Protein (DC-LAMP). Die Reifung dendritischer Zellen wird darüberhinaus durch Interaktionen mit dem angeborenen Immunsystems (TLR-Liganden, NK-Zellen), proinflammatorischen Zytokinen, Hitzeschock-Proteinen, Chemotaxinen und Chemokinen getriggert [JARIWALA, 2007; EL DAROUTI & HAY, 2010].

Derzeit wird angenommen, dass DCs zu einem lokal Haut-ansässigen Immunnetzwerk beitragen [JARIWALA, 2007], wobei in psoriatischen Läsionen eine erhöhte Anzahl an dermalen DCs beschrieben wurde [KRUEGER & BOWCOCK, 2005]. Dendritische Zellen exprimieren verschiedenartige Moleküle, welche chemotaktisch wirken und die Migration weiterer Immunzellen zum Ort der Entzündung bewirken. Typischerweise werden von den DCs während der Immunreaktion Zytokine wie IL-12, TNF α , IFN α , IL-23 und IL-15 produziert und die interagierenden T-Lymphozyten ebenfalls zur Zytokinexpression angeregt [JARIWALA, 2007]. IFN α spielt sowohl in der Stimulation und Proliferation von T-Zellen als auch in der Bildung psoriatischer Hautläsionen eine Schlüsselrolle [JARIWALA, 2007]. IL-12 und IL-23, welches durch eine gemeinsame Untereinheit strukturell nahe verwandt dem IL-12 ist, triggern die Aktivierung von T-Helferzellen und sind somit eng verknüpft mit der nachfolgenden Immunabwehr im Rahmen einer Typ-1 Reaktion [NICKOLOFF et al., 2007]. Desweiteren ist IL-12 auch involviert in die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H1- Zellen und der Aktivierung von NK-Zellen, welche wiederum IFN γ und andere Typ-1 Zytokine wie IL-2 und TNF α produzieren [AGGARWAL et al., 2003]. Eine wichtige Funktion von IL-23 ist die Stimulation von T-Helfer Zellen, die daraufhin IL-17 und IL-22 produzieren. Letzteres Zytokin trägt zur dermalen Inflammation und epidermalen Hyperplasie bei, die für Psoriasis charakteristisch ist [AGGARWAL et al. 2003; ZHENG et al., 2007]. IL-17 induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, hauptsächlich von Endothelzellen und Makrophagen und spielt bei der Entstehung und Persistenz von Autoimmunerkrankungen eine Rolle [KRUEGER & ELLIS, 2005]. Gleichzeitig ist das von DCs synthetisierte IL-15 ein proinflammatorisches Zytokin, das eine T-Zell Proliferation wie auch Haut-

Hyperplasie induziert [JARIWALA, 2007].

Die Migration von Leukozyten zum Hautparenchym wird zum einen chemotaktisch durch Zytokine gesteuert, zum anderen erfolgt eine Transmigration von T-Zellen durch reaktive Gefäße [LEBWOHL, 2003]. Endothelzellen sind in psoriatischen Läsionen aktiviert, was durch spezifische Färbung für das intrazelluläre Adhäsionsmolekül -1 (ICAM-1, auch CD54), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1 oder CD106) und E-selektin (CD62E) nachgewiesen wurde [LOWES et al., 2007]. Die Migration aktivierter T-Zellen aus der Zirkulation in die Dermis wird durch LFA-1/ICAM-1 Interaktionen vermittelt. Die T-Lymphozyten in psoriatischen Läsionen sind polarisiert als T_H1-Helferzellen (T_H1; CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen (T_C1; CD8⁺), wobei darüberhinaus auch eine separate Population von T_H17 Zellen diskutiert wird [LOWES et al., 2007]. Es wurde postuliert, dass die bevorzugte Assoziation zwischen DCs und psoriatischen epidermalen CD4⁺ Lymphozyten zu der Stimulation und anschließenden klonalen Expansion von epidermalen CD8⁺ Zellen führen kann. Neben CD4⁺ T-Zellen und DCs nehmen CD8⁺ Lymphozyten eine zentrale Position in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die im Zusammenhang mit der Psoriasis stehen, ein [JARIWALA, 2007]. Einige CD8⁺ T Zellen sind spezialisiert für das sogenannte „homing“ in die Epidermis über die Expression von $\alpha_E\beta_7$ Integrin, welches an E-Cadherin auf Keratinozyten bindet [LOWES et al., 2007]. Untersuchungen von KRYCZEK et al. zeigten, dass alle IL-17 produzierenden T-Zellen in der Epidermis von psoriatischen Läsionen CD8⁺ waren und dieser Zelltyp nicht in normaler Haut gefunden wurde [KRYCZEK et al., 2008]. Einige CD4⁺ and CD8⁺ T-Zellen tragen einen Oberflächenmarker, der als cutaneous lymphocyte antigen (CLA) [PICKER et al., 1990] bekannt ist. CLA-positive T-Zellen werden aus der Zirkulation rekrutiert und migrieren in die Haut bei Entzündungsreaktionen und werden in Verbindung mit der Pathogenese verschiedener Hautkrankheiten, unter anderem auch Psoriasis, gebracht [PICKER et al., 1993; ROBERT & KUPPER, 1999].

Ein weiterer wichtiger Zelltyp der Psoriasis-Pathogenese sind regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}). Diese wirken immunsuppressiv und unterdrücken IL-10 und TGF- β vermittelt die Aktivität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten auf eine nicht-antigenspezifische Art und Weise sowohl in vivo als auch in vitro [EL DAROUTI & HAY, 2010]. SUGIYAMA et al. wiesen eine verminderte Aktivität der T_{reg} im peripheren Blut und in Hautläsionen von Psoriatikern nach [SUGIYAMA et al., 2005]. Obgleich die absolute Zahl an zirkulierenden T_{reg} von Psoriatikern im Vergleich zu Gesunden nicht

vermindert war, waren diese Zellen jedoch relativ defizient in ihrer Fähigkeit, die Proliferation von Effektor $CD4^+$ Zellen zu unterbinden [SUGIYAMA et al., 2005]. Das erklärt die defekte immunregulatorische Aktivität in der Psoriasis, welche die ungezügelte Aktivierung von T-Lymphozyten und Zytokinproduktion in Hautläsionen zulässt. Obgleich eine Antigenpersistenz die chronische Immunaktivierung erklären könnte, wurden defekte Funktionen regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) als ein weiterer Faktor zum Beitrag der ungezügelten T-Zell Aktivierung postuliert [LOWES et al., 2007].

Gelangen Memory-T-Zellen in die Dermis, werden diese bei wiederholtem Antigenkontakt reaktiviert. Es resultiert deren Differenzierung in T-Effektorzellen, welche inflammatorisch wirksame Zytokine sekretieren. Neben migrierten Immunzellen können aber auch ortsansässige dermale Leukozyten expandieren, um die dichten Infiltrate psoriatischer Läsionen zu bilden [LOWES et al., 2007]. Durch die Aktivität von DCs und T-Lymphozyten werden auch dermale Keratinozyten angeregt, welche ebenso wie die vorab diskutierten Immunzellen in die Pathogenese der Psoriasis auf molekularer Ebene eingreifen können. Keratinozyten stellen eine bedeutende Quelle für inflammatorische Zytokine dar, was wiederum andere Zellen in psoriatischen Läsionen beeinflussen kann [TSCHACHLER, 2007]. Es wird angenommen, dass IL-17 und IFN γ synergistisch agieren, um die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Keratinozyten zu erhöhen [TEUNISSEN, 1998; PISKIN et al., 2006]. Dabei dürfte IFN γ durch Stimulation der Expression von dem antiapoptotischen Protein Bcl-x die Apoptose von Keratinozyten inhibieren, was wahrscheinlich zur Hyperproliferation der Keratinozyten, wie sie in psoriatischen Läsionen beobachtet wird, beiträgt [KRUEGER & ELLIS 2005].

Die TNF α und IFN γ getriggerte Produktion von Zytokinen durch Keratinozyten kann wiederum die Reifung dendritischer Zellen beeinflussen. Als Reaktion auf die Sekretion von TNF α wurde eine übersteigerte Proliferation von Keratinozyten und Erhöhung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen von T-Lymphozyten und Makrophagen und von Adhäsionsmolekülen von Gefäßendothelzellen diskutiert [VICTOR et al., 2002]. TNF α induziert endotheliale Zellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und erhöht die Produktion von VEGF, was zur Angiogenese und Erythem führt [PIETRZAK et al., 2008].

Zwar sind aktivierte T-Zellen notwendig für die Entwicklung und Persistenz psoriatischer Läsionen, dennoch lässt sich die Psoriasis allein auf der Basis von T-

Zell Aktivierung nicht erklären. ALBANESI et al. gehen davon aus, dass intrinsische multigene Veränderungen in ortsansässigen Hautzellen, im speziellen Keratinozyten, essentiell sind für die Entwicklung der Psoriasis. So sind z.B. intrazelluläre Signalwege von Keratinozyten wie STAT1, STAT3 und NF- κ B in psoriatischen Läsionen verändert [ALBANESI et al., 2007]. Ein besonders starker Einfluss auf Keratinozyten wird dem IL-22 zugeschrieben, dessen Expression in psoriatischen Läsionen massiv erhöht ist [WOLK et al., 2009]. IL-22 hat keinen Einfluss auf Immunzellen und wird von einigen Lymphozytenpopulationen einschließlich T_H17-Zellen, T_H1-Zellen und NK-Zellen produziert [WOLK et al., 2009]. Von WOLK et al. konnte gezeigt werden, dass eine IL-22 Behandlung von Keratinozyten in vitro ihre Differenzierung inhibiert und ihre Mobilität erhöht, wobei diese Veränderungen denen in der Psoriasis sehr ähnlich sind. Aufgrund des erhöhten IL-23 Gehalts in psoriatischen Läsionen wurde spekuliert, dass Keratinozyten-produziertes IL-23 durch die Stimulierung von T-Zellen in ihrer Umgebung zur Chronifizierung der Psoriasis beitragen. Die angeregten T-Lymphozyten triggern wiederum die proinflammatorische Zytokinproduktion durch Keratinozyten [PISKIN et al., 2006]. Eine ständige gegenseitige Aktivierung von DCs, T-Zellen und Keratinozyten durch ein komplexes Zytokinnetzwerk könnte sich zu einer Art selbst-amplifizierender Schleife entwickeln, die in einer chronischen Entzündung mit Vasodilatation und Erythem endet [PISKIN et al., 2006, NICKOLOFF et al., 2007].

Im Rahmen der angeborenen Immunität wird in der Psoriasis eine stark erhöhte Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) beschrieben [TSCHACHLER, 2007]. AMPs sind eine bedeutende Komponente der angeborenen Immunität und spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase von Oberflächenorganen wie der Haut. Nahezu alle derzeit identifizierten AMPs sind in erhöhten Mengen in psoriatischen Läsionen detektierbar [HARDER & SCHRÖDER, 2005]. Folglich überrascht es nicht, dass bakterielle Infektionen in psoriatischen Läsionen in der klinischen Praxis nicht beobachtet werden [MROWITZ & REICH, 2009].

Ein neuer interessanter Aspekt im Rahmen der Psoriasispathogenese wurde von SONKOLY et al. eingebracht. Die Untersuchungsergebnisse der Wissenschaftler weisen darauf hin, dass eine Dysregulation bestimmter miRNA an der Pathogenese der Psoriasis mitbeteiligt ist und zur Störung in der Interaktion zwischen ortsständigen und eingewanderten Zellen der Haut beiträgt. Den miRNAs wird in ihrer Funktion als posttranskriptionellen Regulatoren der Genexpression eine

wichtige Rolle in der Entstehung von Krankheitsprozessen zugeschrieben. SONKOLY et al. konnten erstmals, verglichen mit gesunder Haut oder anderen chronisch entzündlichen Hauterkrankungen, ein spezifisches miRNA-Expressionsprofil in psoriatischen Hautläsionen nachweisen [SONKOLY et al., 2007]. Die Psoriasis-spezifischen miRNAs entstammen sowohl Leukozyten als auch Keratinozyten (miR-203). Zusammenfassend werden die Ergebnisse von den Autoren als neue regulatorische Ebene der Pathogenese chronisch entzündlicher Hautkrankheiten eingeschätzt.

Letzendlich kreiert die Summe der zellulären Interaktionen ein Gewebeprofil und einen klinischen Phänotyp, welcher typisch ist für die Psoriasis. Chronifizierung, klinische Beschwerdesymptomatik wie Pruritus und Schmerzen sowie Prädilektionsstellen an sichtbaren Körperarealen haben einen erheblichen negativen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Da es derzeit keine Heilung der Psoriasis gibt, erfolgt die Therapie symptomatisch mit einem für jeden Patienten individuell angepassten Therapieschema. Die Elimination von Provokationsfaktoren sowie die Normalisierung der Hautproliferation stehen ebenso im Fokus der Behandlungsstrategien wie das Eindämmen von inflammatorischen Prozessen. Grundsätzlich kann die Psoriasis topisch, systemisch oder in Kombination von beiden behandelt werden. Insbesondere die Entwicklung von Kortisonpräparaten sowie die Entdeckung der Vitamin D3 Analoga erbrachten einen wesentlichen Fortschritt in der Psoriasis-Therapie. Während die Vitamin D3 Analoga wie Calcipotriol und Tacalcitol die Zellteilung der Keratinozyten unterbinden, wirkt Kortison antiinflammatorisch [MROWIETZ & REICH, 2009]. Als sog. first line Therapie hat sich eine Kombination aus einem mittelpotenten Kortikoid und dem Vitamin D3 Analogon Calcipotriol erwiesen [MROWIETZ & REICH, 2009]. Für Patienten mit schwerer Psoriasis, d.h. hoher Krankheitsaktivität und häufigen Rezidiven, steht die systemische Therapie zur Verfügung. Mit unterschiedlich guter Verträglichkeit, Wirksamkeit und Nebenwirkungen kommen Fumarsäureester, Methotrexat, das Retinoid Acitretin sowie Cyclosporin mit T-Zell spezifischen Angriffspunkt zum Einsatz [MROWIETZ & REICH, 2009]. Die in den letzten Jahren eingeführten Biologika bereichern das Spektrum der Psoriasis-Systemtherapie enorm. Sie zeichnen sich nicht nur durch ein gutes Nutzen-Risiko-Profil aus, sondern können auch bei Patienten, die mit herkömmlichen Therapeutika nicht mehr ausreichend behandelt werden können, erfolgreich eingesetzt werden [RIEDL, 2008]. Im Gegensatz zu den konventionellen

Systemtherapeutika sind Biologics gen- bzw. biotechnologisch produzierte Moleküle lebender Zellen wie therapeutische AK (Fusionsproteine) und Zytokine. Die biologischen Agenzien sind gegen spezifische inflammatorische Mediatoren wie TNF oder mehr allgemein auf DCs und T-Zellen ausgerichtet [MROWIETZ & REICH, 2009], deren zentrale Rolle im Pathomechanismus der Psoriasis bereits vorab beschrieben wurde. Generell scheint die immunologische Synapse ein effektiver Fokus für die Therapie der Psoriasis mit Verminderung der Krankheitsschwere zu sein.

1.3. Psoriasis assoziierte Komorbiditäten

Inzwischen ist anerkannt, dass die Psoriasis eine Modellerkrankung der chronischen Entzündung darstellt und als Systemerkrankung mit einem hohen Risikopotential für Folgeerkrankungen bis hin zu einer erhöhten Mortalitätsrate zu begreifen ist. Notwendig wird bei der Behandlung der Psoriasis auch ein Blick hinter die klinisch sichtbare Ausprägung der Erkrankung, fokussiert auf relevante Komorbiditäten. Zu diesen Begleiterkrankungen gehören das metabolische Syndrom, kardiovaskuläre Erkrankungen, sog. Lifestyle-Faktoren, chronisch entzündliche Erkrankungen sowie Neoplasien [GOTTLIEB & DANN, 2009; BOEHNCKE et al., 2009] (vgl. Abb. 4). Das Verständnis der zugrundeliegenden Zusammenhänge ist für das Management der Psoriasis und der assoziierten Komorbiditäten wichtig.

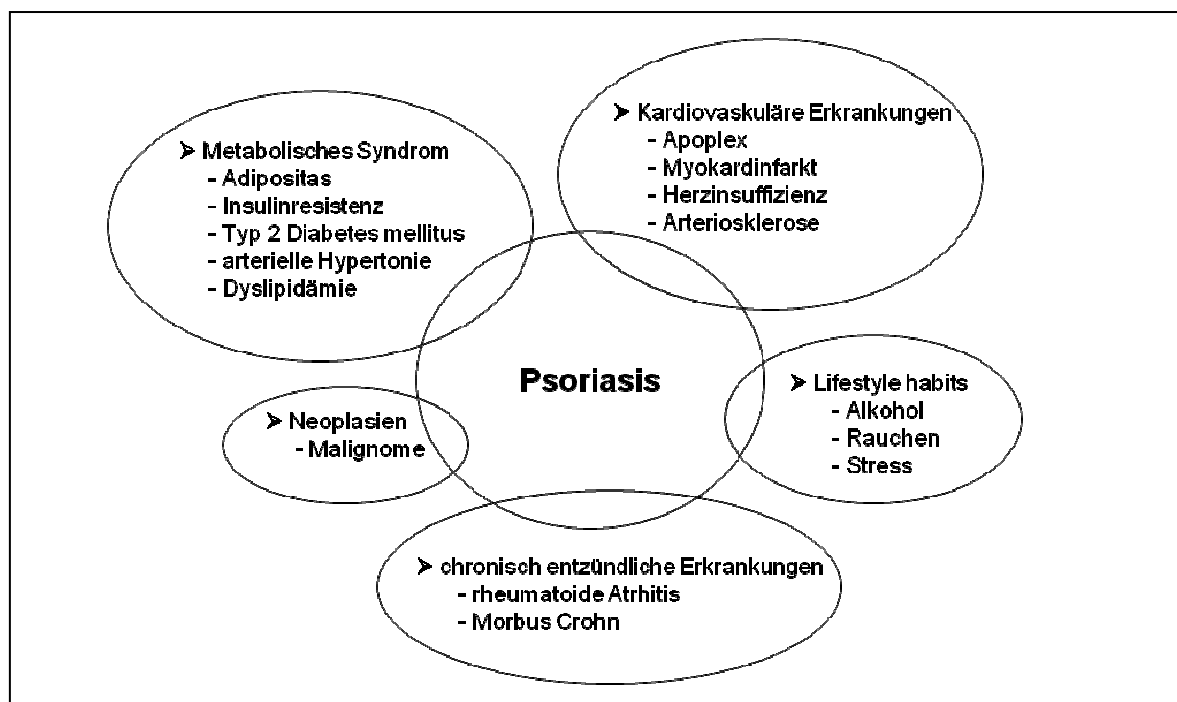


Abb. 4: Komorbiditäten der Psoriasis.

Adipositas ist eine gängige Begleiterkrankung von Psoriasis und verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass Patienten mit Psoriasis in höherem Maß übergewichtig bzw. adipös sind, verglichen mit Patienten ohne Psoriasis [GOTTLIEB & DANN, 2009; AZFAR & GELFAND, 2008; MURRAY et al., 2008].

Ob Adipositas ein beitragender Faktor zur Psoriasis oder eine Manifestation der Psoriasis ist, wird derzeit noch diskutiert. Dem im klinischen Bild der Adipositas dominierenden weißen Fettgewebe (WAT) kommt aus pathophysiologischer Sicht eine besondere Bedeutung zu. Das Fettgewebe kann über sekretierte bioaktive Mediatoren und von Adipozyten produzierte Adipokine mit anderen Organen wie Gehirn, Herz, Gefäßen, Leber und Muskel kommunizieren und diese beeinflussen und damit modulierend in Hämostase, Blutdruck, Lipid- und Glucosemetabolismus, Entzündung und Arthereosklerose eingreifen [RABE et al., 2008, LAGO et al., 2007; OUCHI et al., 2011]. Es gibt sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Adipokine (s. Abb. 5) und die Balance zwischen den verschiedenen Faktoren ist wichtig für die Homöostase des gesamten Körpers.

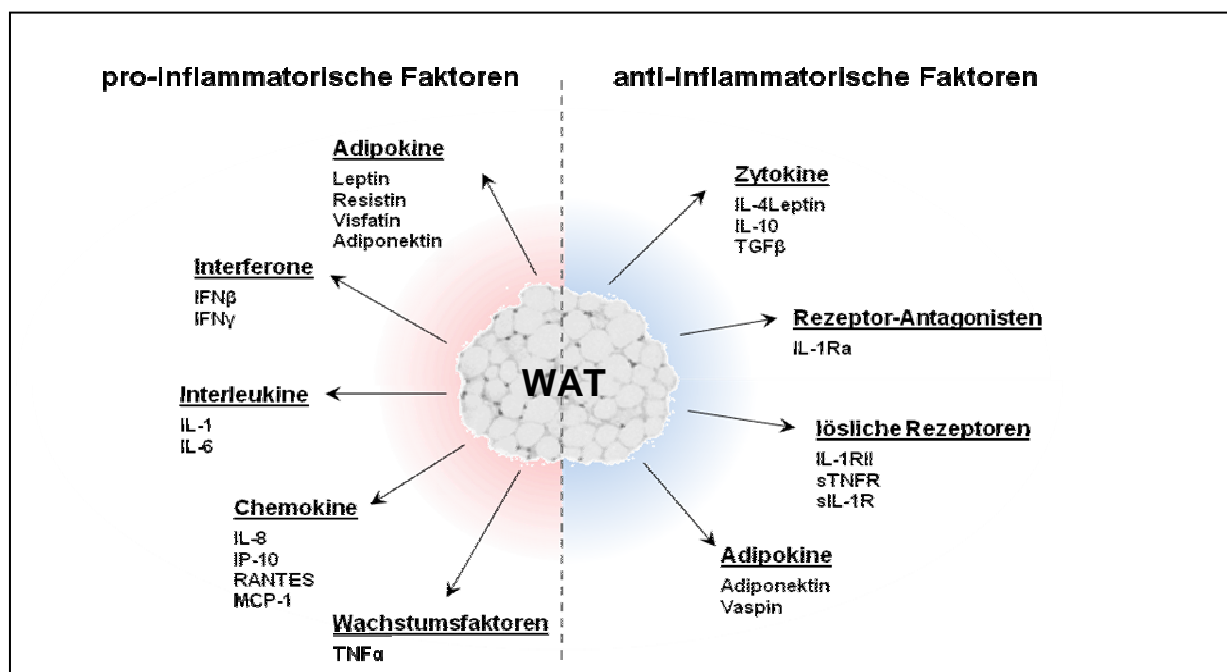


Abb. 5: Von weißem Fettgewebe (WAT) produzierte biologisch aktive Moleküle.
modifiziert nach WOZNIAC et al. 2009

Auf Grund der Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Adipozyten und durch sekundär in das Fettgewebe eingewanderte Zellen des Immunsystems wird Adipositas heute als ein Zustand chronischer Entzündung angesehen [KARASTERGIOU & MOHAMMED-ALI, 2010]. Aktuelle Anhaltspunkte lassen schlussfolgern, dass Überernährung zu einer Hypertrophie der Adipozyten mit nachfolgendem Zelltod führt, welcher als ein Stimulus für die Infiltration von Immunzellen in das Gewebe fungieren kann [KARASTERGIOU & MOHAMMED-ALI, 2010].

Mittlerweile wird das Fettgewebe somit nicht mehr als bloßes Energiespeicherorgan, sondern auch als aktives endokrines Gewebe und als eine das Immunsystem beeinflussende Größe betrachtet [WOZNIAK et al., 2009; LAGO et al., 2007; OUCHI et al., 2011]. Die Theorie, dass weißes Fettgewebe nicht nur ein energiespeichendes Fettdepot ist, sondern auch ein aktiver Beiträger zur Homöostase des gesamten Organismus sein könnte, wurde mit der Entdeckung von Leptin im Jahr 1994 durch ZHANG et al. konkretisiert [ZHANG et al., 1994]. Seitdem wurden über 50 Zytokine und andere Moleküle identifiziert, die das weiße Fettgewebe produziert [LAGO et al., 2007]. Diese sog. Adipokine agieren über parakrine, autokrine, endokrine oder juxtakrine Wirkungsmechanismen in einer großen Vielfalt von physiologischen und pathologischen Prozessen einschließlich Immunität und Inflammation [LAGO et al., 2007]. Der Terminus Adipokine wird zwar für biologisch aktive Substanzen verwendet, die in den Adipozyten des WAT vorkommen, allerdings können diese Faktoren auch an anderen Orten synthetisiert werden und zu Funktionen beitragen, die nicht mit denen des weißen Fettgewebes verknüpft sind [LAGO et al., 2007].

Adipokine stehen an der Schnittstelle zwischen Metabolismus und Immunität, indem sie nicht nur die Entzündung sondern auch die Immun- und Autoimmun-Reaktivität durch systemische Wirkung modulieren [LAGO et al., 2007; OUCHI et al., 2011].

Sie sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung, da ein besseres Verständnis ihres Wirkungsmechanismus prospektiv zur Entwicklung neuer Therapieansätze und Therapeutika führen kann [OUCHI et al., 2011]. Einige Adipokine wie Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin sind mit ihrem molekularen Aufbau sowie ihrem Einfluss auf die angeborene und erworbene Immunität bereits recht gut charakterisiert [LAGO et al., 2007]. Ein weiteres interessantes Adipokin ist Vaspin, dessen physiologische Rolle jedoch bislang noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, das derzeit jedoch nicht zuletzt auf Grund der ihm zugeschriebenen antiinflammatorischen Aktivität im Fokus aktueller Forschung steht.

1.4. Vaspin

Vaspin wurde von HIDA et al. erstmals im Jahr 2005 im Rahmen von Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Adipositas und Insulinresistenz in „Otsuka Long-Evans Tokushima fatty“ (OLETF) Ratten, einem Tiermodell des Typ 2 Diabetes, beschrieben. Es besteht im Menschen aus 395 AS und zeigt ca. 40% Homologie mit α 1Antitrypsin. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Vaspin im weißen Fettgewebe und die Serum Vaspin Spiegel in den Versuchstieren mit zunehmender Adipositas und Insulinresistenz erhöhten. Vaspin führte dabei zu einem Rückgang der Expression von Genen, die für die Insulinresistenz relevant sind wie Leptin, Resistin, TNF α und Glucose-Transporter 4. Mit der daraus resultierenden verbesserten Insulinsensitivität schlussfolgerten die Autoren auf eine Art kompensatorische Antwort der gesteigerten Vaspin Expression, um die Aktivität anderer unbekannter Proteasen, die in Adipositas und Insulinresistenz hochreguliert sind, zu antagonisieren [HIDA et al., 2005].

Vaspin (**V**isceral **a**dipose tissue-derived **s**erine **p**rotease **i**nhibitor) gehört zur Gruppe der **Ser**in **P**rotease **I**nhibitoren, kurz SERPINE, welche eine weit verbreitete und ausgesprochen heterogene Superfamilie hoch konservierter Proteine darstellt. Ihre Gene existieren im Menschen, Tieren, Pflanzen, Viren und Bakterien und bereits im Jahr 2006 waren über 1500 Mitglieder dieser Familie identifiziert [LAW et al., 2006]. Basierend auf phylogenetischen Studien werden die eukaryotischen Serpine in 16 sogenannte „clades“ (A bis P) eingeteilt [IRVING et al., 2000]. Bezogen auf den Menschen sind die zwei bedeutendsten Gruppen der clade A (13 Mitglieder auf Chromosom 1, 14, X) der extrazellulären und der clade B (13 Mitglieder auf Chromosom 18 und 6) der intrazellulären Serpine [LAW et al., 2006].

Überwiegend handelt es sich um inhibitorische Moleküle, welche mit Serinproteasen aber auch Caspasen und Papain-ähnlichen Proteasen interagieren. Sie inhibieren irreversibel und sind wichtiger Bestandteil von Regulationsmechanismen vieler physiologischer Prozesse wie der Blutgerinnung, Komplementaktivierung, Fibrinolyse, Entzündung, Apoptose und Angiogenese, sind aber auch in Neoplasie und die Pathogenese viraler Erkrankungen involviert [LAW et al., 2006]. Die nicht-inhibitorischen Formen der Serpine wie molekulare Chaperone, Hormontransporter und Tumorsuppressoren kommen eher selten vor [LAW et al., 2006]. Typischerweise sind Serpine aus drei β -Faltblättern und neun α -Helices aufgebaut (vgl. Abb. 6).

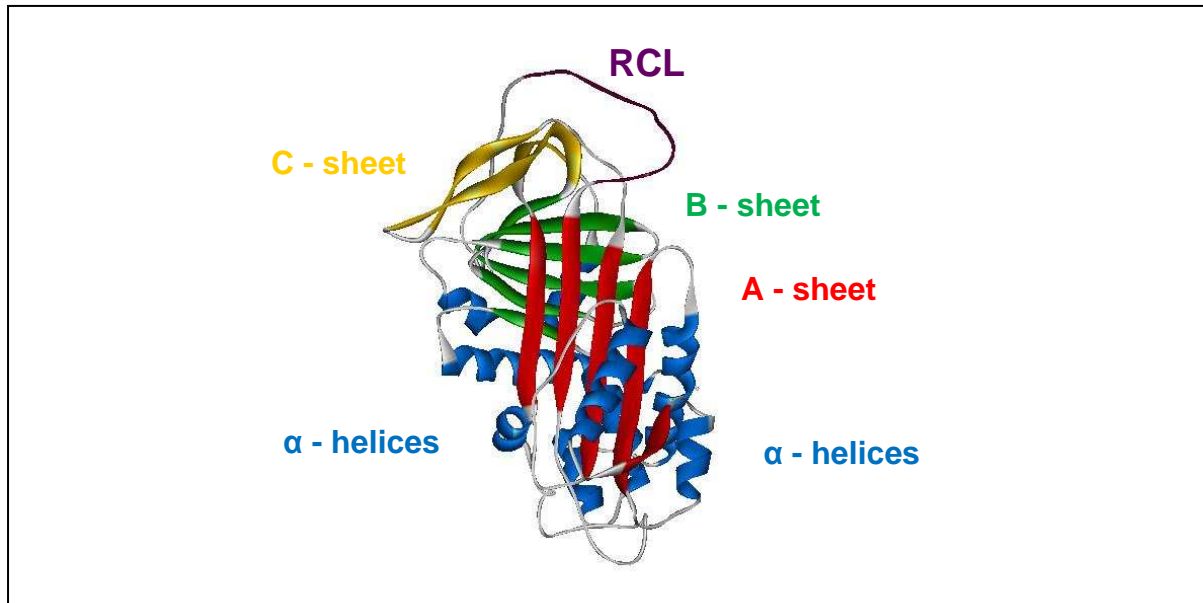


Abb. 6: Proteinstruktur von Vaspin, 3 β -Faltblätter (A-sheet, B-sheet, C-sheet), 9 α -Helices (blau) und RCL (reactive center loop) nachbearbeitet mit WebLab ViewerPro.

Ausgehend von der Kristallstruktur des α 1Antitrypsin (pdb1hp7) erfolgte durch Proteinmodellierung basierend auf Sequenzhomologien die Erstellung der Vaspin-Struktur (Eintrag Q8IW75) durch SWISS-MODEL; (Quelle: <http://www.proteinmodelportal.org/query/uniprot/Q8IW75>)

Klinisches Interesse erlangten die Biomoleküle durch das Auftreten sogenannter Serpinopathien [STABINSKY, 2007]. Hierbei kommt es basierend auf Mutationen zu einer veränderten Konformation und Akkumulation von Serpin-Polymeren im endoplasmatischen Retikulum Serpin-sekretierender Zellen. Es können Krankheitsbilder wie Thrombose (Serpinc1-Antithrombin-Defizienz), Emphyseme (Serpina1-Antitrypsin-Defizienz), Angioödem (Serpinc1-C1 Esterase-Inhibitor-Defizienz), Leberzirrhose (Serpina1 Polymerisation), familiäre Demenz (Serpina1 (neuroserpin) polymerisation) aber auch Allergien folgen [IRVING et al., 2000; LAW et al., 2006]. Serpine regulieren die Aktivität von Proteasen, um die Gewebszerstörung und den ungewollten Zelltod zu limitieren [MANGAN et al., 2008]. Die Funktion der Serpine innerhalb des Immunsystems besteht darin, die Schädigung durch Proteasen an extrazellulären Orten der Entzündung bzw. im Zytoplasma von Effektorzellen und Bystanderzellen zu limitieren.

Eine inhibitorische Aktivität von Vaspin gegenüber bekannten Proteasen wie Trypsin, Urokinase, Faktor Xa, Kollagenase und Dipeptidyl-Peptidase konnte nicht nachgewiesen werden [HIDA et al., 2005]. HIDA et al. postulierten in der oberflächenexponierten RCL (Aminosäuresequenz ab Position 363 = RGTEGAAGTGAQTLPM) eine funktionelle Domäne des Vaspins.

Desweiteren gibt es derzeit keine publizierten Daten bezüglich einer möglichen Vaspin-Rezeptorstruktur. Dagegen wurde die Vaspin mRNA Expression im Menschen bereits für viscerales und subkutanes Fettgewebe [RABE et al., 2008] sowie für die menschliche Plazenta [CAMINOS et al., 2009] dokumentiert. Dabei wurde dem Ernährungsstatus ein signifikanter Einfluss auf die Vaspin-Genregulation zugeschrieben. Die Vaspinexpression wird weiterhin beeinflusst durch Alter, Geschlecht, Behandlung mit Insulin Sensitizern, was zu einer erhöhten Expression führt, und Veränderungen der hypophysären Funktionen [GONZALEZ et al., 2009]. Zusätzlich belegen weitere Daten die Vaspin mRNA Expression in der Leber und in der humanen Epidermis [TOULZA et al., 2007]. Durch real time PCR wurde gezeigt, dass es spezifisch durch granuläre Keratinozyten insbesondere der distalen Hautschicht exprimiert wird [TOULZA et al., 2007]. Die Autoren schlussfolgerten auf eine Rolle von Vaspin im Desquamationsprozess. Da eben dieser Desquamationsprozess in der Psoriasis signifikant gestört ist, könnte Vaspin entweder durch verminderte oder erhöhte Expression in die Pathogenese einbezogen sein. Unter der Annahme einer verminderten Expression von Vaspin in der Haut, könnte sich theoretisch auch dessen antiinflammatorischer Einfluss im umgebenden Gewebe reduzieren und damit zum Erhalt psoriatisch entzündlicher Läsionen beitragen.

1.5. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Rolle von Vaspin in der Pathogenese der Psoriasis evaluiert werden. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Serumkonzentrationen von Vaspin in Psoriatikern und einer Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom BMI zu vergleichen und mögliche Unterschiede statistisch auf Signifikanz zu prüfen.

Weitere Versuche zielten darauf ab, die Expression von Vaspin in der Haut nachzuweisen. Dabei wurde ein Vergleich zwischen gesunden Hautproben und Hautproben aus psoriatischen Läsionen angestrebt. In einem ersten Schritt galt es mittels RT-PCR, Vaspin auf mRNA Ebene in den Hautproben nachzuweisen. Voraussetzung hierfür war die Etablierung eines geeigneten real time PCR Protokolls für die Amplifikation der Vaspin-Zielsequenz.

Mit Hilfe der Immunhistochemie unter Verwendung eines Vaspin spezifischen Antikörpers sollte versucht werden, Vaspin auf Proteinebene in Schnittpräparaten der

Haut nachzuweisen, da es diesbezüglich noch keine literaturbekannten Daten gab. Zur Anfertigung der Kryoschnitte dienten gesunde Hautproben als auch solche mit psoriatischen Läsionen.

Da dendritische Zellen eine initiale Schlüsselrolle in der Immunpathogenese der Psoriasis spielen, war es weiterhin von großem Interesse, einen Einfluss von Vaspin auf Phänotyp und Zytokinexpressionsprofil von DCs zu untersuchen. Da Vaspin als potentiell antiinflammatorisch wirksam beschrieben wurde, wäre dieser Effekt auf die am Anfang der Pathogenese stehenden dendritischen Zellen als positiv zu werten, da hierdurch möglicherweise der Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch DCs entgegengewirkt werden kann. Mit diesem Hintergrund waren weitere Experimente darauf ausgerichtet, in der Zellkultur den Einfluss von Vaspin auf die funktionellen Eigenschaften der dendritischen Zellen zu untersuchen. Hierfür galt es zunächst DCs nach einem Standardprotokoll aus humanen peripheren Blutmonozyten zu generieren. Nach Inkubation der Zellkultur mit Vaspin und LPS zur Ausreifung der DCs sollten die Zellen in Bezug auf Expression spezifischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie getestet werden. Weiterhin galt es, die Kulturüberstände bezüglich veränderter Zytokinsekretion unter Verwendung verschiedener ELISAs zu beurteilen.

2. Material und Methoden

2.1. Spender und Probenmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Haut- und Vollblutproben entstammen zum einen von Personen mit Psoriasis, welche Patienten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig waren. Die Patienten wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die Diagnose Psoriasis wurde nach der Klinik und dem histologischen Befund gesichert. Die gesunden Hautproben der Referenzgruppe für Histoschnitte und RNA Isolierung stammen von anonymen Spendern aus chirurgischen Praxen der Stadt Leipzig und wurden im Bereich Brust, Lid, Arm, Ohr entnommen. Die Referenzproben für den Vergleich der Vaspinserumlevel wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Blüher zur Verfügung gestellt. Die für die Gewinnung von DCs notwendigen Vollblutproben wurden von freiwilligen gesunden Spendern für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine genauere Klassifikation ist den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Tab. 1: Hautproben für die quantitative real time PCR

Psoriatiker		Kontrollgruppe	
Patient	Geschlecht	Probe	
1	w	1	Haut gesund
2	w	2	Haut gesund
3	w	3	Haut gesund
4	m	4	Vorhaut
5	w	5	Vorhaut
6	m	6	Vorhaut
7	m	7	Haut gesund
8	w	8	Haut gesund

Tab. 2: Hautproben für histologische Schnittepräparate

Psoriatiker		Kontrollgruppe	
Patient	Geschlecht	Probe	Gewebe
1	w	1	Brust
2	w	2	Brust
3	w	3	Brust
4	m	4	Lid
5	w	5	Lid
6	m	6	Lid
7	m	7	Vorhaut
8	w	8	Vorhaut
9	w	9	Vorhaut

Tab. 3: Spender für Vergleiche der Serumkonzentrationen von Vaspin

Patient	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Periater			Diabetes mellitus	Kontrollgruppe	
				PAS	Systemtherapie			Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]
1	w	44	18,4	1,8	keine		nein	44	19,8
2	w	27	27,3	1,8	Fumarsäure		nein	27	27,4
3	m	51	35,8	7,6	Infliximab		nein	51	35,9
4	m	48	25,2	1,8	keine		nein	48	25,1
5	w	64	21,3	1,8	keine		nein	64	22,1
6	w	31	31,2	12,2	Keine		ja (keine Medikamente)	30	31,5
7	w	52	29,7	8,4	Etanercept		nein	52	30
8	m	59	27,2	9,0	Fumarsäure		nein	59	27,1
9	m	42	30,6	1,8	Cyclosporin		nein	43	30,5
10	m	61	31,5	2,4	Cyclosporin		nein	61	31,4
11	m	61	33,4	2,3	keine		ja (Insulin, Metformin)	61	33,5
12	m	36	26,2	9,1	Fumarsäure		nein	36	26,1
13	w	76	26,2	nb	Methotrexat		nb	76	26
14	w	43	37,2	nb	Cyclosporin		nb	44	37,3
15	m	20	31,5	2,4	Etanercept		nein	20	30,9
16	w	59	35	9,3	Etanercept		nein	59	35,5
17	w	59	38,8	5,4	Etanercept		nein	59	39
18	m	57	25,2	nb	Methotrexat		nb	57	25,1
19	w	67	23,8	0,8	Cyclosporin		nein	67	23,5
20	m	68	23,7	9,0	keine		nein	68	23,7
21	w	59	24,1	1,8	Actretine		nein	59	24,1
22	m	56	33,4	0,8	Etanercept		nein	56	33,3
23	w	28	40,2	nb	Fumarsäure		nb	28	40,2
24	m	43	33,3	14,5	Methotrexat		nein	43	33,1
25	w	50	24,8	1,8	Actretine		nein	50	25,1
26	w	42	18,7	4,0	Methotrexat		nein	42	19
27	m	61	31,5	2,4	Cyclosporin		nein	61	31,4

nb.....nicht bekannt; m.....männlich; w.....weiblich

Tab. 4: Vollblutproben für die Gewinnung von DCs

Spender	Geschlecht
1	w
2	w
3	w
4	m
5	w
6	m
7	m
8	w
9	w

2.2. RNA-Isolierung aus Hautproben

Die mit TRIZOL[®] (0,5 ml, Invitrogen) versetzten und bei -80°C gelagerten Stanzbiopsien der Haut wurden aufgetaut und 1x 30 sec mit Ultraschall (Rotorstator Homogenizer T25basic; IKA, Staufen, Germany) bearbeitet. Es wurden 0,5 ml TRIZOL[®] zupipettiert und erneut mit Ultraschall behandelt, bis keine groben Stücke zu sehen waren. Die Proben wurden für 5 min bei RT belassen. Vor Aufarbeitung der nächsten Gewebeprobe erfolgte eine gründliche Reinigung des Ultraschallkopfes mit Ethanol, DEPC-Wasser, Ethanol, Isopropanol und zum Schluss wieder Ethanol.

Nach Zusatz von 0,2 ml Chloroform wurde das Röhrchen/Tube 15 sec per Hand geschüttelt und 3 min stehen gelassen. Nach Überführen der Suspension in ein Tube erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 10 min mit 13000 bis 14000 rpm. Aus der Oberphase wurde die RNA mit Isopropanol (300 bis 350 µl) bei RT gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde erneut bei 4 °C für 10 min mit 13000 bis 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Isolierung der RNA fand unter einem nur für diesen Zweck reservierten Abzug statt. Für die nachfolgende reverse Transkription erfolgte eine Reinigung der RNA Proben mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die quantitative und qualitative Bestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch mit dem NanoDrop (s. Pkt. 2.6.).

2.3. Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA wurde als Ausgangsmaterial jeweils 1 µg gereinigte RNA eingesetzt. Unter Verwendung des cDNA Kit der Firma Promega und dem GeneTherm Thermocycler (Pharmacia, Freiburg, Germany) erfolgte die reverse Transkription nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von Oligo(dt)15 Primer 500 µg/ml; M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/µl; rRNAsin RNAase-Inhibitor 40 U/µl in drei Schritten:

1.) RNA und Primer

Komponente	Volumen
RNA (1 µg)	x µl
Oligo-dt Primer (1:10)	1 µl
H ₂ O	x µl
Total volume	13 µl
Inkubation 5 min 70 °C, danach auf Eis	

2.) Mastermix

Komponente	Volumen
5x Puffer	4 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
MMLV-Enzym	1 µl
RNAsin (1:10)	1 µl
Total volume	7 µl

- 3.) **13 µl** (RNA, Oligo) und **7 µl** (Mastermix) vereinigen und 1h bei 42°C inkubieren, danach Tube für 5 min auf 95 °C erhitzen, danach Tube auf Eis stellen

Die nun vorliegende einzelsträngige cDNA wurde für die quantitative real time PCR verwendet. Eine Zwischenlagerung der cDNA in einem Volumen von 20 µl wurde bei -20 °C vorgenommen.

2.4. Herstellung eines Vaspin-Standards für die quantitative real time PCR

Herstellung eines Plasmides

Es erfolgte die Klonierung eines Vaspin cDNA Fragments in den Plasmid-Vektor pJET1.2 unter Verwendung des CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). Hierfür wurde aus einer Hautprobe zunächst RNA (s. Pkt. 2.2.) isoliert und mittels reverser Transkription (s. Pkt. 2.3.) in cDNA umgeschrieben. Diese fungierte als Template für die Generierung eines 108 bp Vaspinfragments durch PCR (s. Pkt. 2.7.) unter Verwendung genspezifischer Primer (forward: aagatcgccccctcatc; reverse: agtctgtgctccggtgcc). Nach dem Auftragen des PCR Ansatzes auf einem 2% igen Agarosegel wurde die entsprechende Produktbande ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Es wurde weiter nach dem 5 Schritt Protokoll des Herstellers (Sticky-End Cloning Protocol) verfahren, wobei 3 µl Vaspin DNA Fragment verwendet wurden.

1.) Blunting-Reaktion

Komponente	Volumen
2x reaction buffer	10 µl
Vaspin Fragment (53,7 ng)	3 µl
Water, nuclease free	4 µl
DNA blunting Enzyme *	1 µl
Total volume	18 µl
Tube vorsichtig vortexen und 3-5 sec zentrifugieren	

* keine Konzentrationsangabe des Herstellers

2.) Es erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 5 min. Anschließend wurde das Tube auf Eis abgekühlt.

3.) Ligationsreaktion

Komponente	Volumen
Blunting reaktion	18 µl
pJET1.2/blunt cloning vector (50 ng/µl)	1 µl
T4 DNA Ligase (5U/µl)	1 µl
Total volume	20 µl
Tube vorsichtig vortexen und 3-5 sec zentrifugieren.	

- 4.) Der Ligationsmix wurde bei RT (22 °C) für 30 min inkubiert.
- 5.) Für die anschließende Transformation von *E. coli* wurde der Ligationsmix ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Plasmidamplifikation und Plasmidpräparation

50 µl kompetente *E. coli* Zellsuspension (DH5α) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Ligationsmix versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec dem sich eine 3 minütige Inkubation auf Eis anschloss. Nach Zusatz von 300 µl SOC Medium wurde das Tube bei 37 °C für 1h inkubiert. Zwischen 100 µl und 150 µl Zellsuspension wurden auf LB_{amp} Platten ausgespatelt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Transformatanten wurden gepickt und in ca 5 ml LB_{amp} Flüssig-Medium überführt. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C für 24 h erfolgte eine Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Mittels Sequenzierung des Plasmides konnte das Vaspininsert in der korrekten Basenfolge identifiziert werden. Anschließend erfolgte der Einsatz des erhaltenen Plasmids für die Herstellung von Standard-Verdünnungsreihen für die quantitative real time PCR zur Bestimmung des Expressionslevels von Vaspin mRNA in Hautproben.

2.5. DNA Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8; 2 mM EDTA) bei Spannungen von 80-120 V und Agarosekonzentration von 2 %. Die Agarosegele enthielten zum Anfärben der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Den Proben wurde zum Auftragen auf das Gel Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 120 mM EDTA; 50% Glyzerin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt. Als Größenmarker wurde bei der Elektrophorese eine 1 kb DNA-Leiter der Firma GibcoBRL aufgetragen. Zur Dokumentation von im Agarosegel aufgetrennter DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem Cybertech CS1 (Cybertech, Berlin) in Verbindung mit einem Transilluminator verwendet.

2.6. Photometrische Bestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration an RNA bzw. DNA in den Proben wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) bestimmt. Es erfolgte eine Messung bei 260 nm sowie bei 280 nm um proteinogene Verunreinigungen abschätzen zu können. Der Quotient aus der Extinktion bei 260nm zu 280nm wurde als Maßstab für die Reinheit der DNA betrachtet [SAMBROOK, 2001].

2.7. Real time PCR

Als Template dienten die nach Pkt. 2.3. hergestellten cDNA Proben der Hautbiopsien (s. Tab. 1). Als externe Standards kamen Plasmide mit dem zu amplifizierenden Gensegment zum Einsatz. Das Plasmid mit der Vaspin-Sequenz wurde wie unter Pkt. 2.4. beschrieben hergestellt, der RPS26 enthaltende Vektor war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert. Die Standardkurven wurden im Bereich zwischen ca. 1×10^3 und 1×10^9 Kopien/Reaktion erstellt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der Plasmid dsDNA ($\mu\text{g/ml}$) erfolgte die Berechnung der verwendeten Kopienzahl (Anzahl der Moleküle) im Ansatz nach folgender Formel [GIULIETTI et al., 2001]:

$$\frac{C \times 91,24}{(A + B)} \times 10^{10}$$

C= Konz Plasmid in ng/ml
A= Länge des Leervektors in bp
B= Länge des Insert in bp

Die verschiedenen Verdünnungsstufen des Standards wurden als Doppelbestimmung in getrennten Reaktionen amplifiziert. Im Kontrollansatz wurde kein Template zupipettiert.

In einem ersten Schritt erfolgte die Herstellung eines Mastermixes (s. Tab. 5), der dann für die nachfolgende PCR herangezogen wurde. Folgende Reagenzien kamen zum Einsatz: SYBR[®] green I (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, German), dNTP mixture (Bioline, Luckenwalde, Germany); GenTherm DNA-Polymerase, PCR buffer (Rapidozym, Berlin, Germany).

Tab. 5: Herstellung des Mastermixes

1x Mastermix	
Komponente	Volumen
Wasser	11,5 µl
10x Gentherm-Puffer	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
SYBR (1:2500 in DMSO)	1 µl
Taq (Gentherm) 1:10 in Wasser	1 µl
Primer 1 (RPS26 20 pmol/µl; Vaspin 10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (RPS26 20 pmol/µl; Vaspin 10 pmol/µl)	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Total volume	18 µl
18 µl Mastermix + 2 µl cDNA (1:3) oder RPS26-Plasmid-DNA (Standard)	

Alle Primer wurden von Metabion (Martinsried, Germany) bezogen; RPS-26 forward: 5'-GGCTGTAGTCCTGCCAGAAG-3', reverse: 5'-TTCACATACAGCTTGGGAAGCA-3'; Vaspin forward: AAGATCGCCCCTCATC; reverse: AGTCTGTGCTCCGGTGCC). Die Spezifität der verwendeten Primer wurde mittels Analyse mit BLAST sichergestellt. Die Reaktionen wurden im Rotorgene 3000 cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) durchgeführt und mit der Rotor-Gene real-time Analysis Software 6.1 ausgewertet. Das in der Arbeitsgruppe für die Amplifizierung des RPS26 - Fragments optimierte PCR Programm ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab.6: Optimierte PCR-Programm zur Amplifizierung des RPS26-Fragments

Temperatur	Zeit	Ablauf	Zyklen
95 °C	5 min	Hot Start	1
95 °C	10 sec	Denaturierung	35
61 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	45 sec	Elongation	
80 °C	15 sec	Fluoreszenzmessung	
70 °C – 95 °C		Melt analysis	1

Zur Amplifizierung des Vaspin-Fragments erfolgte zunächst eine Optimierung der PCR Bedingungen, da bei Verwendung der regulären Annealingtemperatur von 59°C unspezifische Nebenprodukte (s. Abb. 8) auftraten. Nachfolgend wurde die Konzentration der Primer halbiert und letztendlich das Verfahren einer touch down PCR angewendet, bei dem in den ersten Zyklen eine höhere Annealing Temperatur zum Einsatz kommt. Dies führt insbesondere in der initialen Phase der PCR zur spezifischen Produktsynthese. Das optimierte PCR-Programm für die Amplifizierung des Vaspin-Fragments ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Zur Analyse der PCR Produkte wurden DNA-Agarosegele verwendet, welche mit Ethidiumbromid gefärbt wurden. Es erfolgte weiterhin die Erstellung einer Schmelzkurve am Ende der PCR, um die Spezifität der amplifizierten DNA zu verifizieren. Zur Quantifizierung der Zielsequenz in den Hautbiopsien wurden die Standardverdünnungsreihen (jeweils getrennt für RPS26 und Vaspin) herangezogen. Das Target-Gen (Vaspin) wurde normalisiert zu dem unregulierten housekeeping-Gen RPS26 (VINCENT et al., 1993).

Tab. 7: optimiertes PCR-Programm zur Amplifizierung des Vaspin-Fragments

Temperatur	Zeit	Ablauf	Zyklen
95 °C	5 min	Hot Start	1
95 °C	10 sec	Denaturierung	1
61 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	45 sec	Elongation	
80 °C	15 sec	Fluoreszenzmessung	
95 °C	10 sec	Denaturierung	1
60 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	45 sec	Elongation	
80 °C	15 sec	Fluoreszenzmessung	
95 °C	10 sec	Denaturierung	30
59 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	45 sec	Elongation	
80 °C	15 sec	Fluoreszenzmessung	
70 °C – 95 °C		Melt analysis	1

2.8. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut

Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten

Hautproben von Psoriatikern sowie das Referenzmaterial wurden in kleinen Blöcken auf Filterpapierstreifen mit Einbettmedium aufgelegt, ausgerichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es erfolgte eine Zwischenlagerung bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung. Von den Blöcken wurden mit dem Schlittenmikrotom (Kryotom Shandon FE Thermo Scientific, Astmoor, UK) in einer Dicke von 7 µm histologische Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Diese konnten bei Bedarf bei -20 °C aufbewahrt werden.

Immunhistochemie

Die Kryoschnitte wurden aufgetaut und mindestens 2 Stunden bei RT oder über Nacht getrocknet. Danach erfolgte eine Fixierung für 10 Minuten in eiskaltem Aceton mit anschließendem Trocknen. Die einzelnen Schnitte auf einem Objektträger wurden mit einem Fettstift umrandet, um ein Verlaufen der AK-Lösung zu vermeiden. Der primäre Vaspin-AK (Vaspin, human mAb (VP63) Enzo Life Sciences; vorab 1:100 in 1x PBS + 5% FKS verdünnt) wurde in einer feuchten Kammer bei RT über Nacht auf den Histoschnitten inkubiert, danach 3 x mit PBS/0,1% Tween abgewaschen. Gebundener Primärantikörper wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Technik nachgewiesen (Supersensitive Multilink AP Ready-to-use Detection System; Biogenix, San Ramon, CA). Der biotinylierte Sekundärantikörper (1:100 in RPMI/1% FKS) inkubierte für 1 h bei RT auf den Schnitten und wurde hiernach mit 1 x PBS + 0,1% Tween20 in einem dreimaligen Waschschrift entfernt. Es schloss sich eine Inkubation mit SA-AP für 1 h bei RT an. Danach wurde 2 x mit PBS/0,1% Tween und 3 x nur 1 x PBS gewaschen und die OT im PBS bis zur Entwicklung belassen.

Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mittels einer New Fuchsin Substratlösung (Dako, Hamburg, Germany), welche wie folgt frisch zubereitet wurde:

- 2 Tropfen aus Flasche A in 2 ml Eppi vorlegen und mit Aqua dest auf 2 ml auffüllen, 1 Tropfen aus Flasche B hinzugeben und mischen, 100 µl Levamisol Gebrauchslösung zugeben und mischen
- 1 Tropfen aus Flasche C und 1 Tropfen aus Flasche D in ein weiteres 2 ml Eppi geben, vorsichtig mischen, 3 min stehen lassen
- beide Eppis vereinen, mischen

Die Substratlösung wurde auf die Histoschnitte aufgebracht und die Reaktion bei ausreichendem Farbumschlag von farblos zu rosarot mit Aqua dest abgestoppt. Es schloss sich eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 bis 10 min an. Die Objektträger wurden anschließend in Leitungswasser gestellt und unter leicht fließendem Wasser für 10 min belassen. Nach dem Abtropfen des Wassers erfolgte das Eindecken der Präparate in Aquatex.

2.9. Gewinnung und Kultivierung von Monozyten und dendritischen Zellen

Monozyten als Vorläuferzellen der dendritischen Zellen wurden aus venösem Humanblut von Spenderpersonen gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte steril unter Verwendung heparinisierter (Heparin-Natrium 5000; Ratiopharm) 50 ml Spritzen (LuerLock, BD) mit Butterflyaufsatz. Es wurden 100 ml Heparin-Blut 1:1 mit sterilem PBS (RT, Dulbecco's PBS steril; PAA) verdünnt. In 50 ml Falcon Tubes wurden 15 ml Ficoll (RT, Ficoll-Paque-Plus, Dichte 1,077 g/ml; GE Healthcare) vorgelegt und mit 35 ml PBS-Blut überschichtet. Die Röhrchen wurden 30 min bei 500 g, RT, Beschleunigung 4, Bremse 0 zentrifugiert. Zeitgleich wurden auf Eis 50 ml Tubes mit 25 ml eiskaltem PBS befüllt. Aus den zentrifugierten Röhrchen wurde mit einer Pasteurpipette der Interphasering entnommen und in je 1 PBS Tube überführt, wobei gegebenenfalls mit PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 270 g für 7 min, 4°C (Beschleunigung 9, Bremse 7). Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit kaltem PBS resuspendiert und in einem 50 ml Tube vereinigt. Nach Zentrifugation bei 270 g, 4 °C und 7 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 800 µl kaltem MACS[®] Puffer (Miltenyi) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl CD14-Microbeads (CD 14 Microbeads, human; Miltenyi) erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 15 min, wobei das Tube aller 3 min geschwenkt wurde. Nach Auffüllen des Tubes auf 50 ml mit kaltem PBS erfolgte eine Zentrifugation bei 270 g, 4 °C für 7 min. Zeitgleich wurde eine LS-Säule (MACS[®] Separationssäulen, Miltenyi) in den zugehörigen Magneten (MACS[®]-Midi-Magnet; Miltenyi) eingesetzt und mit 4 ml MACS[®] Puffer equilibriert. Der Überstand des 50 ml Tubes wurde verworfen und das Pellet in 4 ml MACS[®] Puffer mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die LS-Säule wurde mit der Zellsuspension beladen und 3mal mit je 2 ml MACS[®] Puffer gewaschen. Zur Elution

wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein 15 ml Elutionstube gestellt. Nach dem Auftragen von 4 ml MACS[®] Puffer auf die Säule wurde durch Durchdrücken mit einem Spritzenstempel eluiert. Für die Zellzählung wurden 10 µl abgenommen, der restliche Eluat bei 270 g, 4 °C für 5min zentrifugiert. Zeitgleich erfolgte die Zellzählung unter Verdünnung der 10 µl Eluat mit 90 µl Trypanblau in einer Zählkammer nach Neubauer (Tiefe 0,1 mm; Fläche 0,0025 mm²). Das erhaltene Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes auf 1 Millionen Zellen pro 1 ml DC-Gebrauchsmedium eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension wurden in 24-well Platten ausgesät und für 4-6 Tage bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert.

DC-Gebrauchsmedium

je 10 ml DC-Medium [RPMI 1640 (GIBCO), 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO, -20 °C), 1% L-Glutamin (GIBCO, -20 °C), 10 mM HEPES (GIBCO), 1% MEM 100x (GIBCO), 2% FKS (Promocell)]
Zusatz von:

- 1.) 7,2 µl human GMCSF (Leukine, Sagamostim 5x500 µg/ml von Berlex),
- 2.) 100 µl human IL-4 (PeproTech, 10 µg + 1 ml Aqua Braun steril, vortexen, + 4 ml PBS steril (PAA), vortexen a 100 µl Aliquots bei -20 °C lagern)

2.10. Kultivierung von Monozyten mit Vaspin

Der nach Pkt. 2.9. gewonnenen Monozytenkultur wurde neben IL-4 und GMCSF auch Vaspin in den Konzentrationen 0,1 / 1 bzw. 10 ng/ml in einem Volumen von 10 µl zugesetzt. Nach 3 bzw. 4 Tagen erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellform. Zur Bestimmung der Oberflächenmarker wurden die Zellen wie unter Pkt. 2.12. beschrieben behandelt. Die Überstände wurden entsprechend Pkt. 2.13. mit ELISA auf sekretierte Zytokine untersucht.

2.11. Kultivierung von unreifen DCs mit Vaspin und LPS

Die nach Pkt. 2.9. gewonnene Monozytenkultur wurde 4 Tage mit IL-4 und GMCSF inkubiert, wonach eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellform erfolgte. Während Monozyten eine runde Zellform aufweisen, stellen sich die nach Differenzierung resultierenden DCs mit typischen distalen Ausläufern dar. Es wurden nur adäquat differenzierte Zellen weiterverwendet. Nach 4tägiger Kultivierung erfolgte die Zugabe von Vaspin als Vorinkubation vor der LPS induzierten Reifung der DCs in den Endkonzentrationen 0,1 ng; 1 ng und 10 ng/ml in die entsprechenden Kavitäten in

einem Volumen von 10 µl. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml LPS in die entsprechenden Kavitäten ebenfalls in einem Volumen von 10 µl. Durchgeführt wurde eine Doppelbestimmung pro Konzentration, LPS Kontrollen sowie Kontrollen ohne Zusätze. Die Ansätze wurden weiter bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Von den Überständen wurden nach 4 stündiger LPS Inkubation Proben von je 50 µl für die Bestimmung der TNFα Konzentration entnommen und bei -20°C gelagert. Die Wirkung des LPS wurde lichtmikroskopisch durch sogenannte Clusterbildung der Zellen verifiziert. Nach 24h wurden die Überstände komplett abgenommen und die IL-12, IL-10 IL-23 und IL-6 Konzentrationen im ELISA bestimmt. Es erfolgte weiterhin die Aufarbeitung der Zellen für die Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie.

2.12. FACS-Analysen der DC Oberflächenmoleküle

Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellen mit einer Pipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Platte abgelöst, resuspendiert und in einem Tube pelletiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 200 µl PBS. Je 50 µl Zellsuspension ($1,2 \times 10^5$ bis $2,5 \times 10^5$ Zellen) wurden in eine Kavität einer 96 well Rundbodenplatte überführt und mit je 1 µl des entsprechenden Antikörpers versetzt. Nach Inkubation der Platte für 1 h bei 4 °C erfolgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 100 rpm/min. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und 2mal mit je 200 µl PBS/Gelafusal (PBS mit 10 % Gelafusal (Serumwerke Bernburg, Germany) + 0,1% NaAzid) gewaschen wobei das Pellet durch vorsichtiges Klopfen vom Boden gelöst wurde. Zwischen zwei Ansätzen mit verschiedenen Antikörpern wurde auf der Platte eine Reihe frei gelassen. Nach Aufnahme der Proben in 100 µl PBS/Gelafusal Puffer und Überführen in ein 5 ml Analysenröhrchen (zuvor 100 µl Puffer vorgelegt) erfolgte die Analyse mit dem Zytometer FC 500 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Folgende Antikörper kamen zum Einsatz: aCD80-FITC, aCD83-FITC, aCD86-FITC, aMHCII-PE, aCD14-FITC, aCD16-FITC, aCD1a-PE (Becton Dickenson, Heidelberg, Germany). Für jeden Ansatz wurden mindestens 10 000 Ereignisse im auf lebende Zellen gerichteten Zielbereich gemessen.

2.13. ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen

TNF α ELISA

Zum Einsatz kam der Kit OptEIA™ Set Human TNF der Firma BD. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Überstände der DC- bzw. Monozytenkulturen wurden vorab 1:100 bzw. 1:200 verdünnt.

IL-6 ELISA

Zum Einsatz kam der Kit OptEIA™ Set Human IL-6 der Firma BD. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Überstände der DC- bzw. Monozytenkulturen wurden vorab 1:300 bzw. 1:400 verdünnt.

IL-23-ELISA, IL-12-ELISA, IL-10 ELISA

Zum Einsatz kamen folgende Kits: Human Interkeukin-23 ELISA, Human Interkeukin-10 ELISA bzw. Human Interleukin-12 p70 der Firma eBioscience. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Überstände der Monozyten- bzw. DC-Kulturen wurden für den IL-23 ELISA zwischen 1:2 und 1:10, für den IL-10 ELISA 1:50 und für den IL-12 ELISA 1:5 verdünnt.

2.14. ELISA zur Bestimmung der Serumkonzentration von Vaspin

Die Durchführung der ELISAs wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Blüher durchgeführt, welche auch die Serumproben der Referenzgruppe zur Verfügung stellte.

2.15. Datenabbildung und statistische Auswertung

Die Abbildung der Daten sowie die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Programme GraphPad Prism (Version 5.00), SigmaPlot (Version 12) bzw. Exel (Edition 2007, Microsoft, Redmond, USA).

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit Abbildungen mit PowerPoint (Edition 2007, Microsoft, Redmond, USA) erarbeitet. Das Vaspin-Modell wurde mit dem Programm WebLab ViewerPro (Version 3.5) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der Serum-Vaspinkonzentration von Psoriatikern und Referenzgruppe

Die verwendeten Serumproben der Psoriatiker wurden von Patienten der Hautklinik gewonnen. Die Auswahl der Referenzproben, welche freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Blüher (Endokrinologie, Medizinische Klinik III der Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte unter dem Aspekt des gleichen Geschlechts, gleichen Geburtsjahrgangs und gleichem BMI. Die Bestimmung der Serumkonzentration des Adipokins Vaspin erfolgte mittels ELISA und wurde in der endokrinologischen Klinik durchgeführt.

Die Ergebnisse der ELISAs sind in Abbildung 7 als Serum-Vaspinkonzentration in Abhängigkeit vom BMI dargestellt. Für die Kontrollgruppe ergibt sich eine Korrelation zwischen Vaspin-Konzentration im Serum und dem BMI. Demgegenüber resultiert nach Auswertung der Daten für die Gruppe der Psoriatiker kein direkter Zusammenhang zwischen Vaspin-Konzentration und BMI.

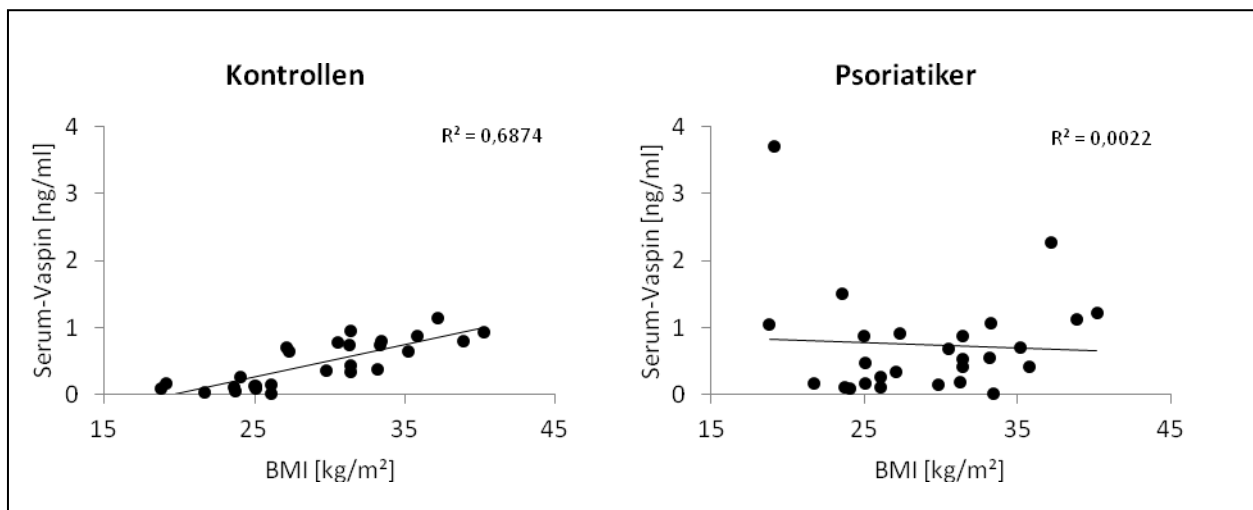


Abb. 7: Serumkonzentration von Vaspin in Abhängigkeit vom BMI in Psoriatikern und der Kontrollgruppe. n=27, mit Regressionsgerade und Bestimmtheitsmaß R^2 erstellt mit EXCEL (Microsoft Office 2007). Vaspin-Serumkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die gesunden Kontrollen wurden bezüglich Geschlecht, Alter und BMI der Psoriatiker abgeglichen (s. Tab. 3).

Um auf statistische Unterschiede der beiden Gruppen zu prüfen, erfolgte eine Teilung der Populationen gemäß der Gewichtsklassifikation (Europa, USA) nach Normalgewicht

(BMI 18,5 - 24,99), Übergewicht bzw. Präadipositas (BMI 25,0 – 29,99) und Adipositas (BMI $\geq 30,0$). Unter Verwendung des Mann-Whitney Tests konnte in der Gruppe der Individuen mit Normalgewicht ein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und Psoriatikern ermittelt werden (s. Abb. 8). Bei ausgeprägter Adipositas bzw. Präadipositas zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Psoriatikern und Nicht-Psoriatikern.

Im Mittelwert liegt die Vaspin-Konzentration von normalgewichtigen Psoriatikern (1,07 ng/ml) über dem der Psoriatiker mit Übergewicht (0,35 ng/ml) und auch über dem der Psoriatiker mit Adipositas (0,77 ng/ml), wobei die Unterschiede in den Mittelwerten nicht signifikant sind.

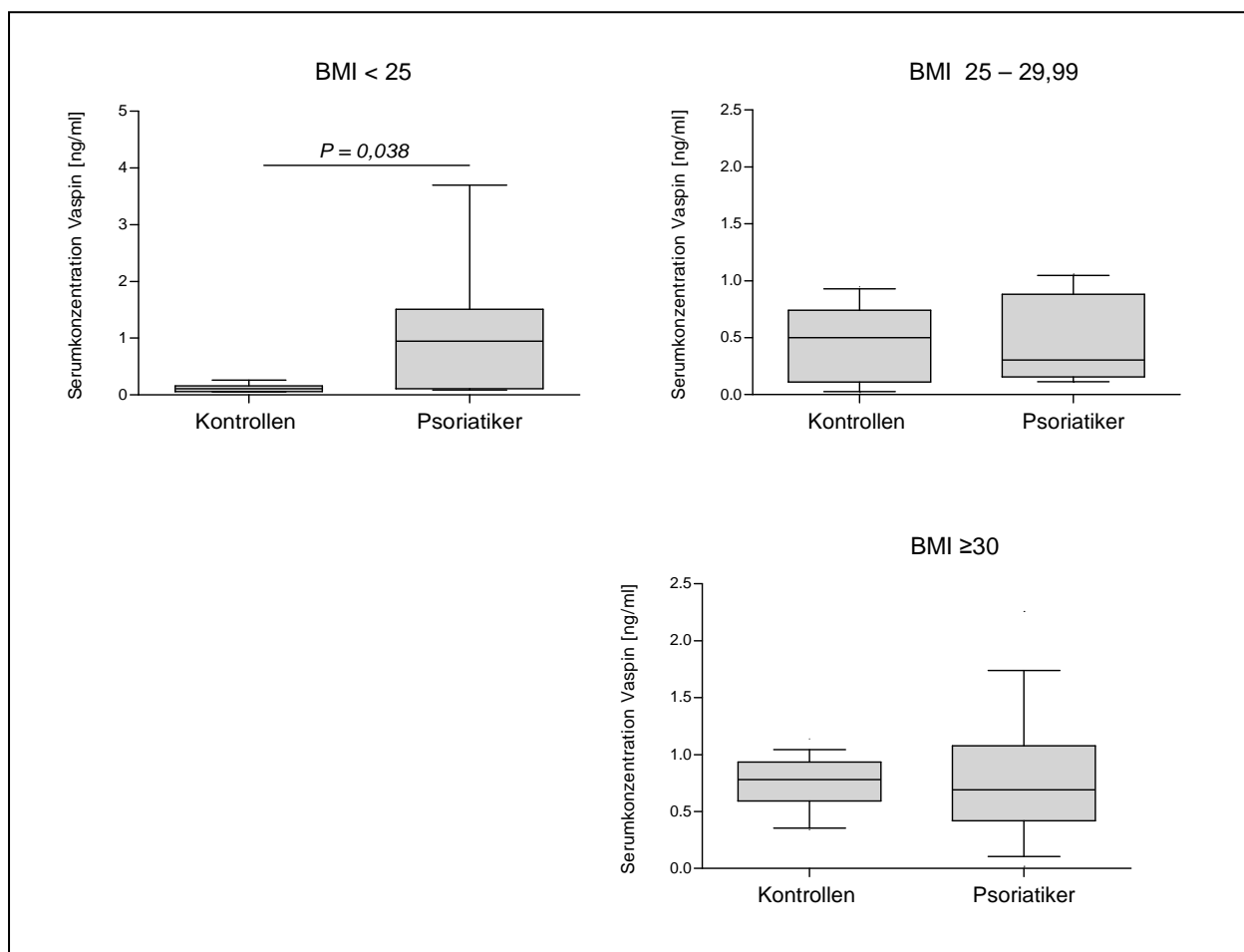


Abb. 8: Vergleich der Serumkonzentration von Vaspin in Psoriatikern und Kontrollgruppen in Abhängigkeit vom BMI. Vaspin-Serumkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Normalgewicht (BMI<25) n=7, Präadipositas (BMI 25-29,99) n=7, Adipositas (BMI \geq 30) n=13. Die gesunden Kontrollen wurden bezüglich Geschlecht, Alter und BMI der Psoriatiker abgeglichen (s. Tab. 3); Abb. erstellt mit GraphPad5 mit MW und STABW.

3.2. Nachweis der Vaspin Expression in Hautbiopsaten

3.2.1. Nachweis von Vaspin mRNA mittels RT- und real time PCR

Für die Herstellung eines Vaspin-Standards erfolgte zunächst die Isolierung von RNA aus einer Hautprobe (s. Pkt 2.2). Nach anschließender Aufreinigung diente diese zur Generierung eines cDNA Strangs durch reverse Transkription (s. Pkt. 2.3.), welcher wiederum als Template in der nachfolgenden PCR zur Synthese eines 108 bp umfassenden Vaspinfragments unter Verwendung genspezifischer Primer herangezogen wurde. Für die Einklonierung in den pJET Vektor wurde nach Pkt. 2.4. verfahren. Die erfolgreiche Insertion des Vaspinfragmentes in den Vektor sowie die korrekte Basenfolge konnte mittels Sequenzierung verifiziert werden. Das konstruierte Plasmid diente in der real time PCR als externer Standard und wurde in Verdünnungsreihen zur Quantifizierung der Vaspin Expression in verschiedenen Hautproben herangezogen.

Initiale PCR Experimente waren darauf ausgerichtet, geeignete PCR Bedingungen zu ermitteln. Dabei zeigten sich in der Analyse des PCR Mixes mittels Schmelzkurve und DNA-Gel zunächst noch unspezifische Nebenprodukte und Primerdimere (s. Abb. 8, A und C). Durch Halbierung der Primermenge sowie Anwendung eines sogenannten touch down im Annealing-Schritt konnte nach Analyse der Schmelzkurve die Reinheit des spezifischen PCR Produktes signifikant verbessert werden (s. Abb. 9, B). Nebenprodukte waren auf dem DNA-Gel nicht mehr nachzuweisen (s. Abb. 9, C). Zur Normalisierung der Vaspin-Genexpression in Hautproben wurde als konstitutiv exprimiertes sogenanntes Haushaltsgen RPS26 verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein im Labor etabliertes pJET Plasmid mit entsprechendem Insert als Standard sowie ein optimiertes Protokoll (s. Tab. 6, S. 25) verwendet. Auch hier wurden in der quantitativen PCR Verdünnungsreihen des RPS26 Standards angefertigt.

Zur Expressionsanalyse von Vaspin wurden nur solche Hautproben herangezogen, die in der Histologie die Diagnose Psoriasis erhielten. Bei der Isolation der RNA aus Hautbiopsaten zeigte sich durch spektrophotometrische Vermessung der Proben bei 260 und 280 nm eine unzureichende Qualität der RNA Lösungen. Daraufhin wurde vor jeder reversen Transkription eine Aufreinigung der RNA vorgenommen. Der 260/280 Quotient lag nach der Aufreinigung über 1,9. In der anschließenden reversen Transkription erfolgte unter Verwendung von Oligo-dT Primern die Synthese

komplementärer DNA.

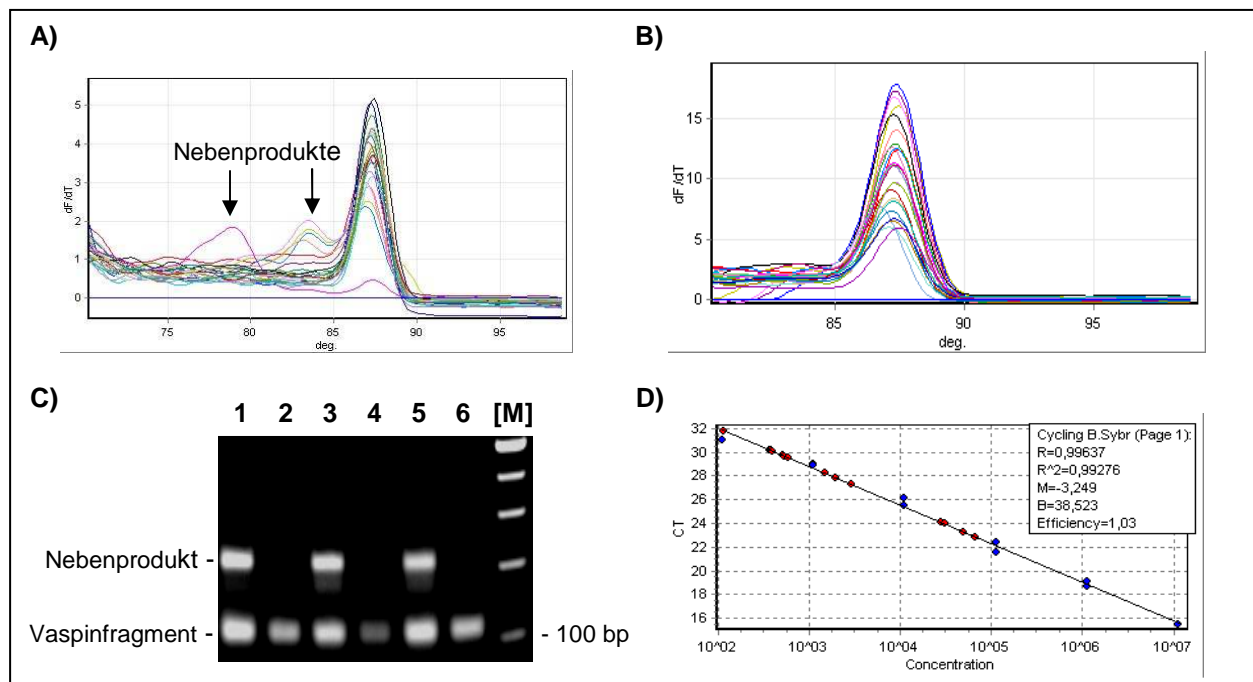


Abb. 9: Auswertung der real time PCR zum Nachweis von Vaspin mRNA in Hautbiopsaten. Nach RNA-Isolierung aus Hautbiopsaten und deren Aufreinigung erfolgte eine reverse Transkription. Die generierte cDNA diente als Template in den PCR Reaktionen.

A) Schmelzkurven-Analyse des Vaspin-PCR Produkts mit unspezifischen Nebenpeaks mit Standardprotokoll; **B)** optimiertes Protokoll mit spezifischem Schmelzpeak; **C)** DNA-Gel mit Vergleich des PCR Ansatzes nach Standardprotokoll – lane 1, 3, 5 (vgl. A) und optimiertem Protokoll – lane 2, 4, 6 (vgl. B); **D)** Beispiel Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung (blau = Standard, rot = Proben)

Diese cDNA diente als Template für die real time PCR unter Verwendung optimierter Protokolle, wobei die Erstellung von DNA Schmelzkurven die Verifizierung der Produktreinheit erlaubte (s. Abb. 9, B). Die Produktbande auf Höhe von 100 bp (vgl. Abb. 9 C) konnte in allen getesteten Hautproben generiert werden und entspricht dem erwarteten 108 bp Vaspin-Fragment.

Da die Anzahl an getesteten Hautproben sehr gering war ($n=6$) erfolgte eine absolute Quantifizierung der Vaspin und RPS26 Zielsequenzen unter Verwendung eines seriell verdünnten Standards zum einen für Vaspin und zum anderen für das Housekeeping Gen RPS26 lediglich als Pilotversuch. Verschiedene Verdünnungsstufen des Standards wurden in getrennten Reaktionen amplifiziert und die resultierenden Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus Startkopienzahl aufgetragen (Abb. 9 D). Nach Berechnung der Kopienzahl durch das Computerprogramm erfolgte die Normalisierung der Vaspinexpression gegen RPS 26 als Quotient. Ein statistisch signifikanter

Unterschied im Vaspin-Expressionslevel zwischen gesunder Haut und psoriatischen Läsionen konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut

Die nach Pkt. 2.8. angefertigten Kryoschnitte der Hautbioptate wurden einer immunhistochemischen Detektion von Vaspin unter Verwendung eines spezifischen Vaspin Antikörpers unterzogen. Da eine Expression des Adipokins im subkutanen Fettgewebe bereits mehrfach in der Literatur dokumentiert wurde, erfolgte ein Test des Antikörpers auf geeigneten Schnittproben. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse zeigen eine Bindung des Antikörpers im Randbereich der subkutanen Fettzellen (s. Pfeile Abb. 10).

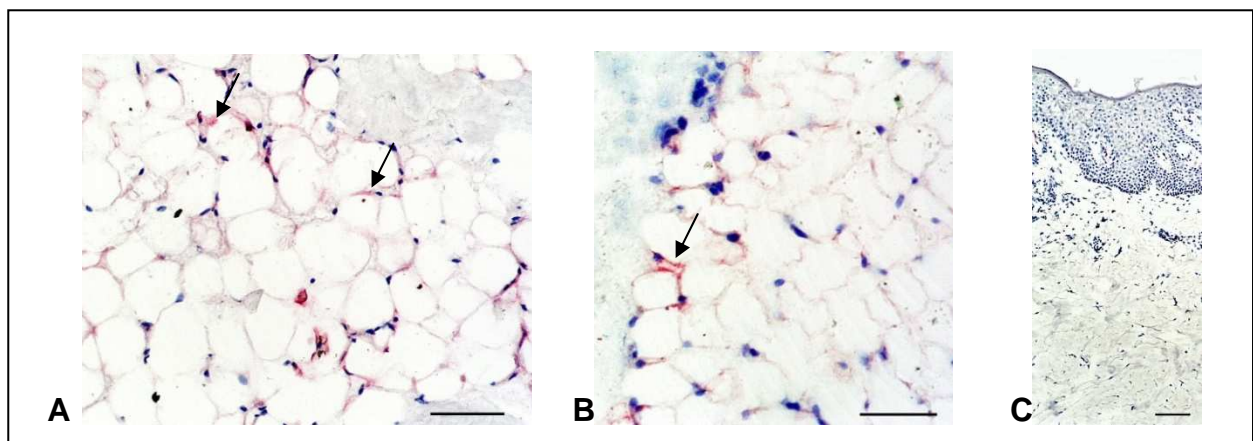


Abb. 10: A und B Immunhistochemischer Nachweis von Vaspin mit spezifischem anti-Vaspin AK im subkutanen Fettgewebe. Balken 50 µm; **C) Negativkontrolle.** Balken 100 µm; Zellkerne in den Kryoschnitten wurden mit Hämalaun gefärbt

Weiterhin konnte Vaspin erstmals auf Proteinebene sowohl in psoriatischen Läsionen als auch gesunder Haut in allen Biopaten nachgewiesen werden. Exemplarisch sind in Abbildung 11 je 3 Hautproben mit Kontrolle abgebildet. Innerhalb der psoriatisch-veränderten Hautproben (Abb. 11, A-C) fällt die homogene rosarote Färbung der Epidermis auf, die auf eine spezifische Bindung des Vaspin-AK zurückzuführen ist. Damit lässt sich auf eine gleichmäßige Verteilung von Vaspin in der Epidermis schließen. In den Schnittpräparaten der gesunden Haut konnte ebenfalls eine spezifische Reaktion des Antikörpers in allen Epidermisschichten verzeichnet werden. Jedoch ist hier die Färbung des Stratum granulosum intensiver (s. Pfeile Abb. 11), was auf eine lokal höhere Konzentration an Vaspin schließen lässt. In der Dermis war Vaspin nicht nachzuweisen. Durch Anfertigung von Kontrollen wurden unspezifische

Reaktionen in der Immunhistochemie ausgeschlossen (s. Kontrollen Abb. 11).

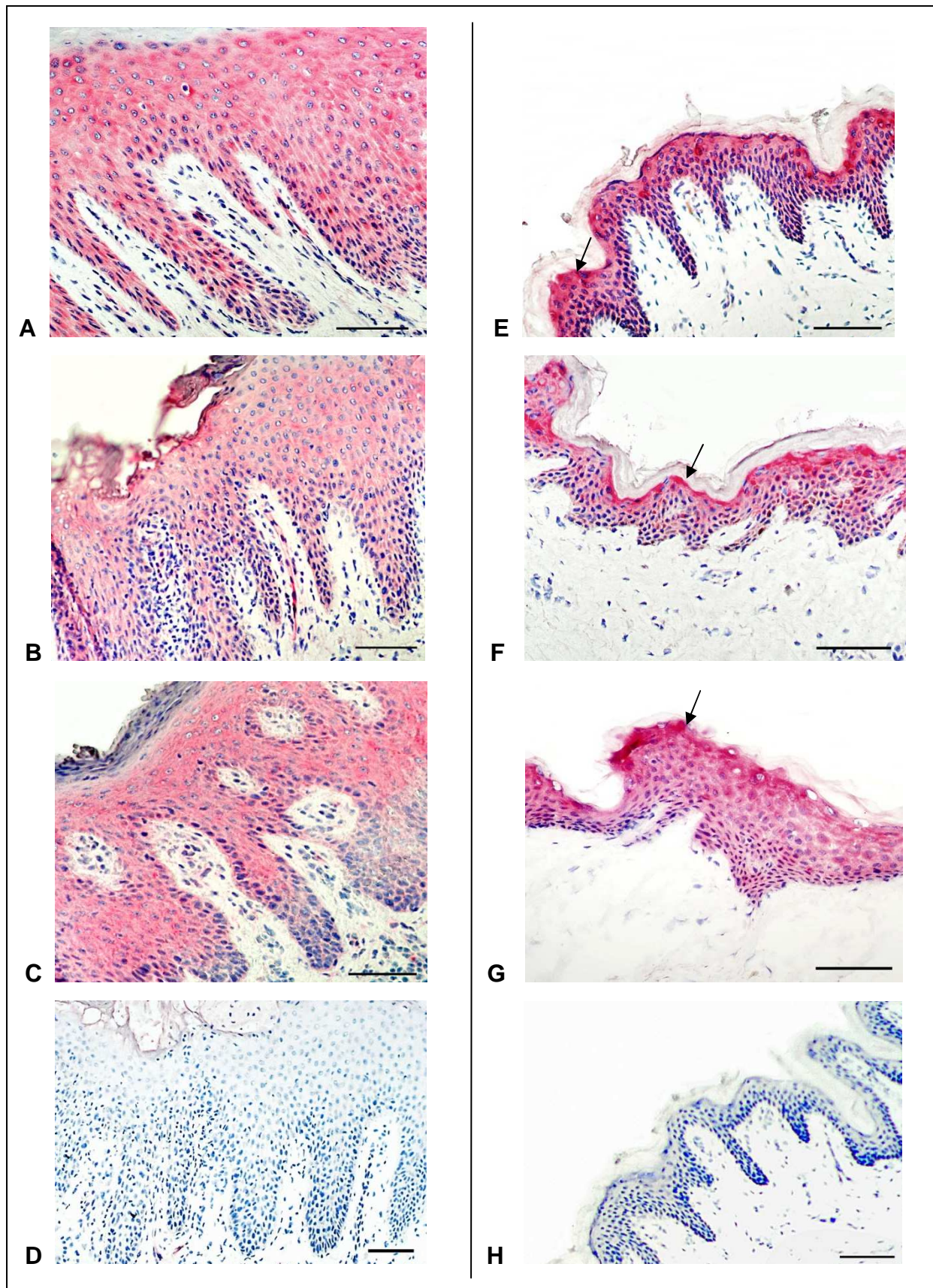


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis von Vaspin mit spezifischem anti-Vaspin AK in psoriatischen Hautläsionen (A-C) und gesunder Haut (E-G); Negativkontrollen D (Psoriatischer) und H (gesunde Haut). Balken 100 µm; Zellkerne in den Kryoschnitten wurden mit Hämalaun gefärbt. Pfeile – stärkere Färbung im Stratum granulosum.

3.3. Sequenzvergleich von Vaspin mit bekannten Protease-Inhibitoren

Unter der Annahme, dass Vaspin ein SERPIN mit inhibitorischer Aktivität gegenüber Proteasen ist, könnte es in den epidermalen Desquamationsprozess mit seinen verschiedenen Proteasen einbezogen sein. HIDA et al. postulierten in der oberflächenexponierten RCL (Aminosäuresequenz ab Position 363 = RGTEGAAGTGAQTLPM) eine funktionelle Domäne des Vaspins. Nachfolgend wurde deshalb ein Sequenzvergleich zwischen der RCL und inhibitorischen Regionen verschiedener relevanter Protease-Inhibitoren durchgeführt (s. Abb. 12).



Abb. 12: Alignment der inhibitorischen Regionen relevanter Protease-Inhibitoren und der RCL von Vaspin. Es wurde das Alignmentprogramm des European Bioinformatics Institute

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) genutzt. Die Sequenzen entstammen der Datenbank UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>). SPA12=Vaspin, A1AT= α 1-Antitrypsin, A2MG= α 2Macroglobulin, ELAF=Elafin, SLPI=Secretory leukocyte protease inhibitor, ISK5=LEKTI=lympho-epithelial Kazal type 5 inhibitor (Domänen 5,6,10,11).

Dabei zeigte Vaspin sequentiell kaum Gemeinsamkeiten mit den klassischen Kallikrein inhibierenden Domänen des LEKTI (lympho-epithelial Kazal type 5 inhibitor) (s. Abb. 11, Alignment 4). Im Vergleich mit dem α 2-Makroglobulin zeigten sich ebenfalls kaum Sequenzübereinstimmungen (s. Abb. 11, Alignment 2). Zum Inhibitor der humanen Leukozyten Elastase (HLE), SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), und dem Inhibitor der Proteinase-3 aus Leukozyten, Elafin (auch skin-derived antileukoprotease = SKALP), zeigte die Vaspin-Sequenz eine Übereinstimmung in 3 Aminosäuren (G, P, M) (s. Abb. 11, Alignment 3). SLPI ist ein säurestabiler Inhibitor mit starker Affinität für Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Cathepsin G, wobei die für Cyhmotrypsin und Elastase relevante Substratbindungsstelle bei einem Leucin und Methionin liegt (in Abb. 11 Alignment 3 unterstrichen). Die größte Übereinstimmung der Vaspin RCL wurde mit der inhibitorischen Region des α 1-Antitrypsin (SERPIN A1) detektiert.

3.4. Einfluss von Vaspin auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften von DCs

3.4.1. Charakterisierung der aus Monozyten generierten DCs

Aus 100 ml Blut konnten $1,9$ bis $3,6 \times 10^7$ CD14⁺ Zellen gewonnen werden. Dem Kulturmedium der präparierten Monozyten wurde zur Differenzierung zu dendritischen Zellen IL-4 und GM-CSF zugesetzt. Nach 4 tägiger Inkubation erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie. Während Monozyten eine runde Zellform aufweisen, stellen sich die nach Differenzierung resultierenden DCs mit deutlicher Zunahme ihrer Zellgröße und typischen distalen Ausläufern dar. Es erfolgte weiterhin eine durchflusszytometrische Bestimmung relevanter Oberflächenmarker. Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse belegen den Übergang von CD14⁺ Monozyten zu überwiegend CD1a⁺ dendritischen Zellen mit einem Anteil von über 60%. Es konnte eine moderate Expression von MHC II Molekülen detektiert werden. Der Anteil positiver Zellen lag hier bei ca 50%. Die Aktivierungs- bzw. Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 wurden nur von sehr wenigen Zellen exprimiert. Zusammenfassend entsprachen die generierten Zellen einem unreifen DC Phänotyp.

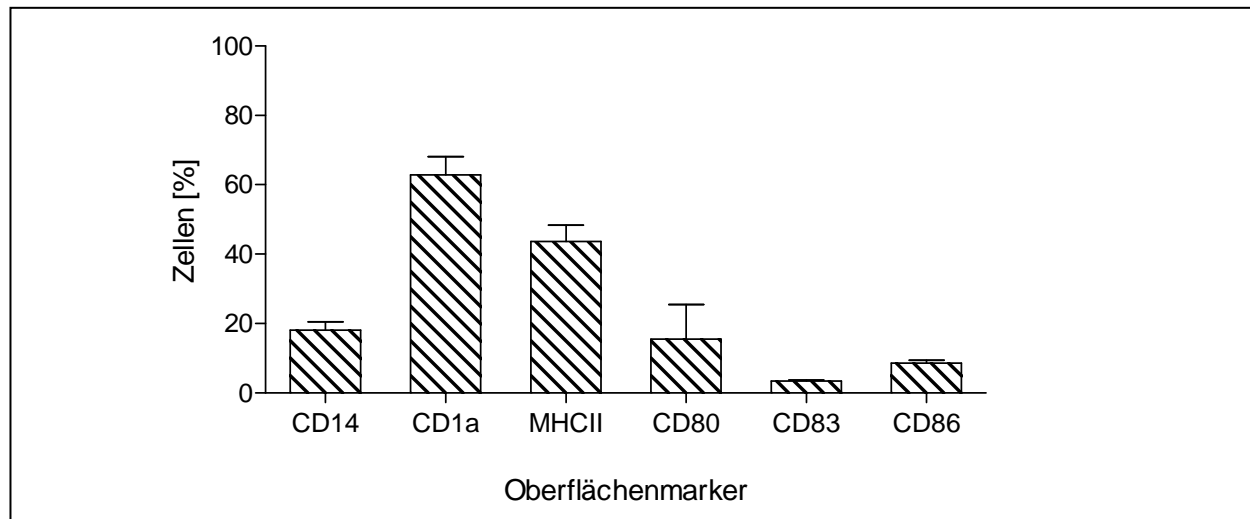


Abb. 13: Phänotypische Charakterisierung der aus Monozyten gewonnen DCs. Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Durchflusszytometrisch wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper Oberflächenmoleküle der generierten DCs detektiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen; n=3.

3.4.2. Einfluss von Vaspin auf die Differenzierung von Monozyten zu DCs

In initialen Experimenten wurde getestet, ob Vaspin möglicherweise einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess der Monozyten zu DCs hat. Nach 4-tägiger Inkubation der Monozyten mit IL-4 und GM-CSF sowie Vaspin in der Konzentration 1 ng/ml erfolgte zunächst eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie. Im Vergleich mit der Kontrolle ohne Vaspin zeigten die Ansätze mit dem Adipokin keine Veränderungen, wobei die Zellen die für DCs typischen distalen Ausläufer aufwiesen. Die Analyse der zellulären Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie zeigte ebenso keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss von Vaspin bezogen auf die Kontrolle. Die analysierten Zellen exprimierten wenig CD14 (s. Abb. 14) dafür jedoch ca 70% den für dendritische Zellen charakteristischen CD1a-Marker. Die detektierte geringe Expression der CD83 und CD86 Moleküle ist ebenso typisch für unreife DCs wie die moderate Expression von MHCII Molekülen, welche als Zeichen für die potentielle Bereitschaft der Zellen, Antigene aufzunehmen, gewertet werden kann. Die Mean Fluoreszenz Werte differierten nicht (Daten nicht gezeigt). Weiterhin erfolgte eine Analyse der Kulturüberstände auf die Sekretion von Zytokinen. Dabei konnte weder in den Ansätzen mit Vaspin noch in den Ansätzen ohne Vaspin TNF α , IL-6, IL-10, IL-12 und IL-23 gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

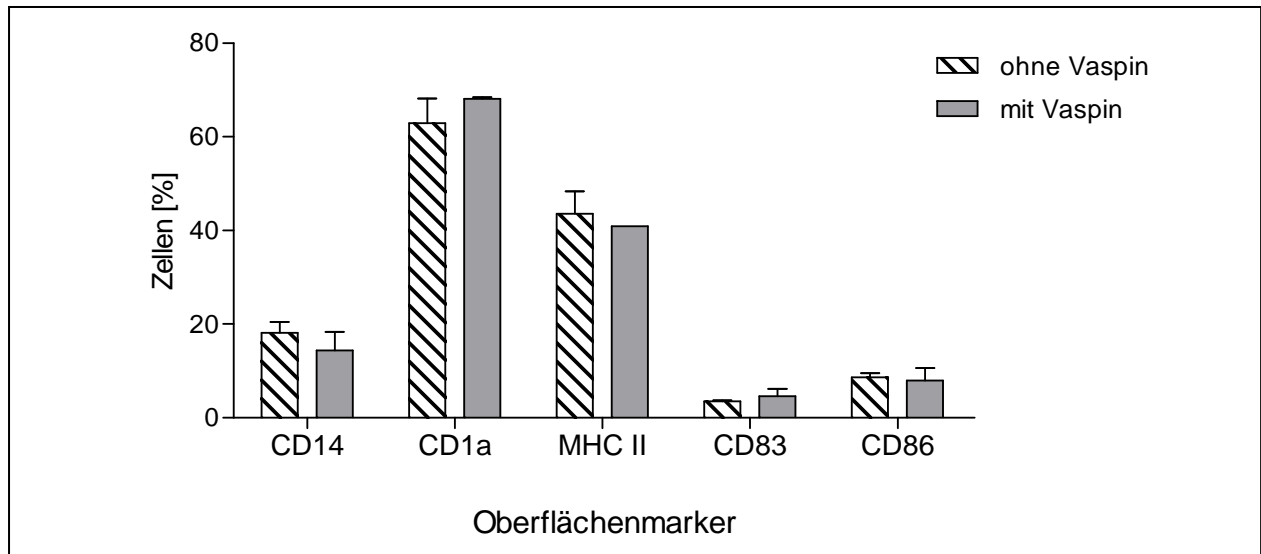


Abb. 14: Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen während der Differenzierung von Monozyten zu DCs. Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage teils mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, zum anderen erfolgte die Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und Vaspin (1 ng/ml). Durchflusszytometrisch wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper Oberflächenmoleküle der generierten DCs detektiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen; n=3.

3.4.3. Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen LPS-stimulierter DCs

Nach einer Präinkubation der unter Punkt 3.4.1. charakterisierten unreifen DCs mit Vaspin in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml für zwei Stunden erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) um die Reifung zu induzieren, wonach die Inkubation fortgesetzt wurde. Es konnte hier bereits 4 Stunden nach LPS Zugabe mikroskopisch eine deutliche Clusterbildung der DCs beobachtet werden. Nach weiterer Inkubation für insgesamt 24 Stunden wurden die Zellen zur Phänotypisierung durchflusszytometrisch untersucht (s. Abb. 15). Als Referenz dienten Kontrollen mit LPS (ohne Vaspin) sowie Kulturen ohne LPS und ohne Vaspin. Die nach 24-stündiger LPS Stimulation untersuchten DCs der Kulturen mit LPS und Vaspin zeigten einen deutlichen Anstieg der Reifemarker CD80, CD83 und CD86 positiven Zellen mit 80%-90% im Vergleich zu unreifen DCs (vgl. Abb 13). Der Anteil an MHCII positiven Zellen stieg im Vergleich zu unbehandelten unreifen DCs auf ca 75% an. Der relativ hohe Anteil an CD1a⁺ und geringe Anteil an CD14⁺ Zellen kann als Hinweis auf die stattgehabte Differenzierung von Monozyten zu DCs interpretiert werden.

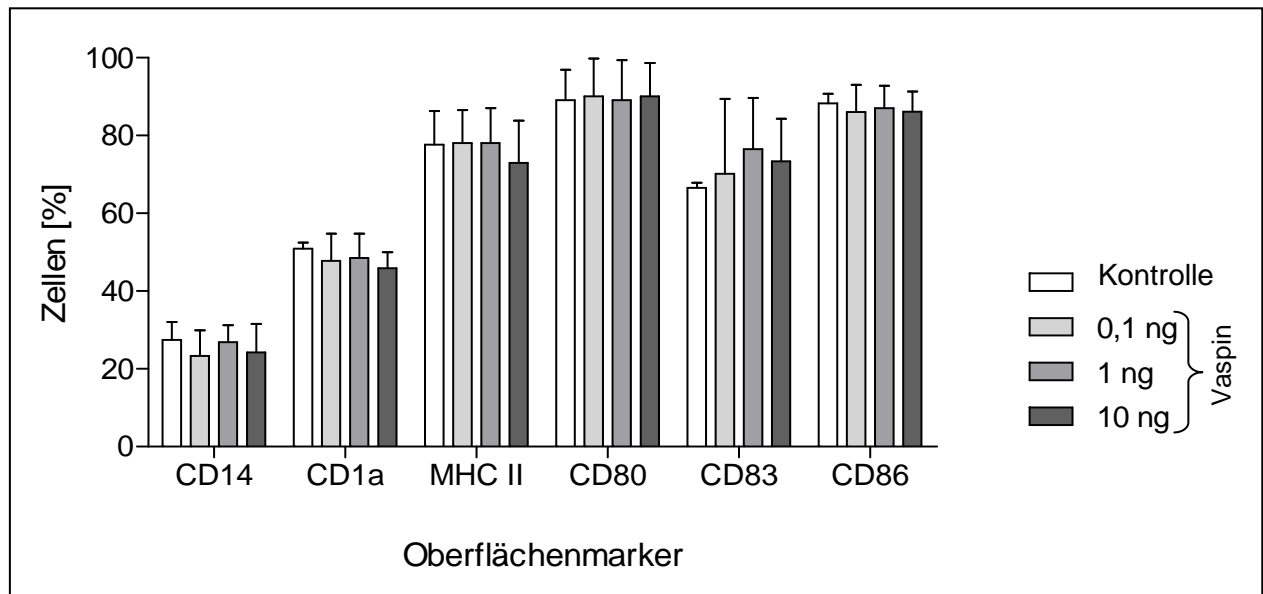


Abb. 15: Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen LPS-stimulierter DCs. Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert, danach mit LPS (100 ng/ml) versetzt und 24 h inkubiert. Durchflusszytometrisch wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper Oberflächenmoleküle der generierten DCs detektiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen. Versuche mit CD1a, CD14, CD80 n=2; CD83 und CD86 n=3; MHCII n=4; Kontrollen (nur LPS) CD1a und CD14 n=2; CD80, CD83, CD86 und MHCII n=6.

Im Vergleich zu den Kontrollen ohne Vaspin aber mit LPS konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Vaspin-Präinkubationszeit verlängert, indem der Zusatz von Vaspin in Kombination mit GM-CSF und IL-4 direkt zur Monozytenkultur erfolgte. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit LPS versetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Im Ergebnis konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Vaspin behandelten und unbehandelten Zellen in der Expression von Oberflächenmarkern detektiert werden. Auch die zeitgleiche Zugabe von Vaspin und LPS zeigte keine Unterschiede bezüglich der Ausprägung von DC Oberflächenmolekülen (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von Reifungs- bzw. Aktivierungsmarkern auf dendritischen Zellen variierte somit nicht mit dem Zeitpunkt der Zugabe des Vaspins. Zusammenfassend hatte Vaspin unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression von Reifemarkern LPS-stimulierter DCs.

3.4.4. Einfluss von Vaspin auf die Zytokinsekretion LPS-stimulierter DCs

Nach der phänotypischen Charakterisierung der dendritischen Zellen wurde das Zytokinsekretionsprofil evaluiert. Die Zytokinproduktion dendritischer Zellen lässt Rückschlüsse über deren Einfluss auf die Immunantwort zu. Daher wurde die Produktion von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12, IL-23 und IL-10 untersucht. In Vorversuchen wurde zur Bestimmung eines geeigneten Zeitpunktes zur Probennahme eine Expressionkinetik der Zytokine erstellt. Im Ergebnis erwies sich für $\text{TNF}\alpha$ der Zeitpunkt zwischen 4 und 5 Stunden nach LPS Zugabe als günstig, für IL-6, IL-10, IL-12 und IL-23 wurden die Kulturüberstände nach 24 Stunden LPS Stimulation zum ELISA verwendet.

Allgemein konnte festgestellt werden, dass die generierten unreifen DCs faktisch keine der getesteten Zytokine sekretierten. Demgegenüber konnten in den Kulturüberständen der mit LPS-stimulierten dendritischen Zellen $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12 und IL-23 detektiert werden. Um die Abweichungen der Vaspin + LPS behandelten Zellen von den Kontrollen (nur LPS) veranschaulichen zu können, erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als BoxPlots. Dabei hatte Vaspin keinen signifikanten Einfluss auf die $\text{TNF}\alpha$ Sekretion LPS-stimulierter DCs (s. Abb.16).

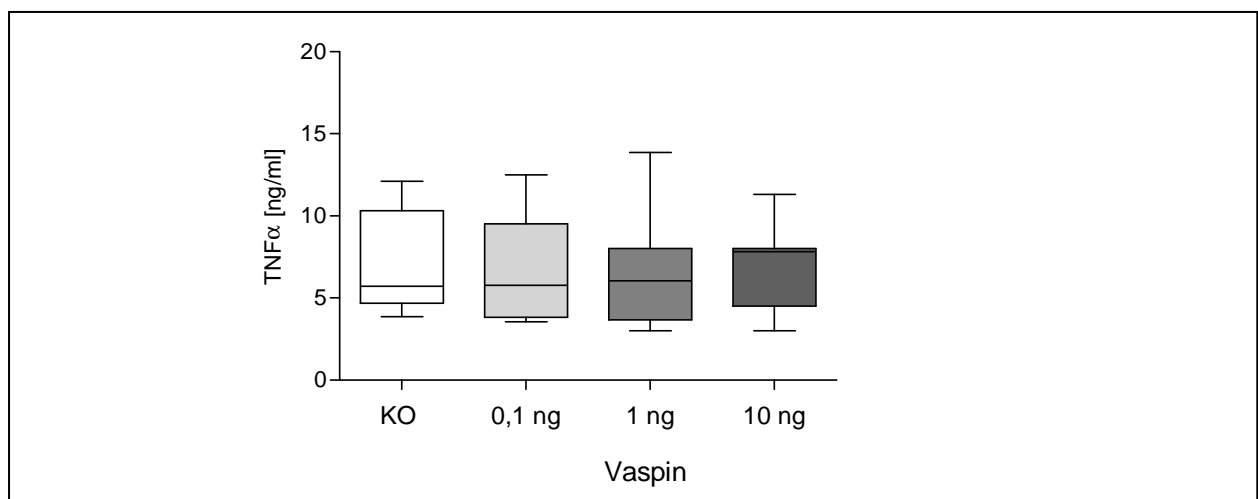


Abb.16: $\text{TNF}\alpha$ Konzentration in Kulturüberständen Vaspin+LPS-stimulierter DCs und nur LPS-stimulierter DCs (=Kontrolle/KO). Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) zur Reifung, wobei nach 4-5-stündiger Inkubation die Probenentnahme für die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte. Vaspin-Konzentration 0,1;1 bzw. 10 ng/ml; KO LPS-Konzentration 100 ng/ml; n=5; Box Plot mit MW und STABW.

Vaspin zeigte ebenso keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierte Expression von IL-6, IL-12, IL-23 und IL-10, wobei die Mittelwerte der Messreihen sehr nahe beieinander liegen (s. Abb. 17-20).

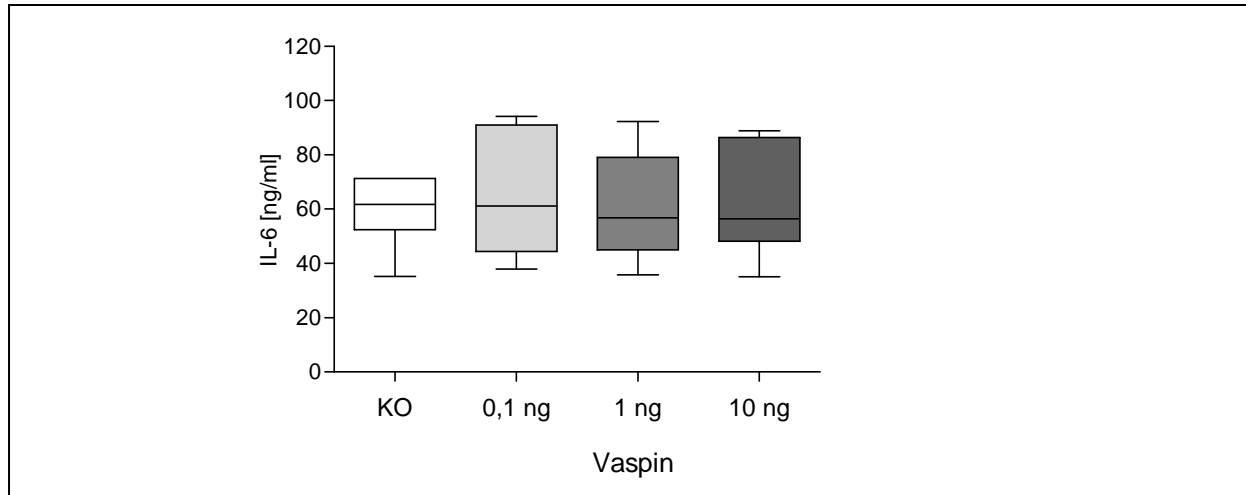


Abb.17: IL-6 Konzentration in Kulturüberständen Vaspin+LPS-stimulierter DCs und nur LPS-stimulierter DCs (=Kontrolle/KO). Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) zur Reifung, wobei nach 24-stündiger Inkubation die Probenentnahme für die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte. Vaspin-Konzentration 0,1;1 bzw. 10 ng/ml; KO LPS-Konzentration 100 ng/ml; n=6; Box Plot mit MW und STABW.

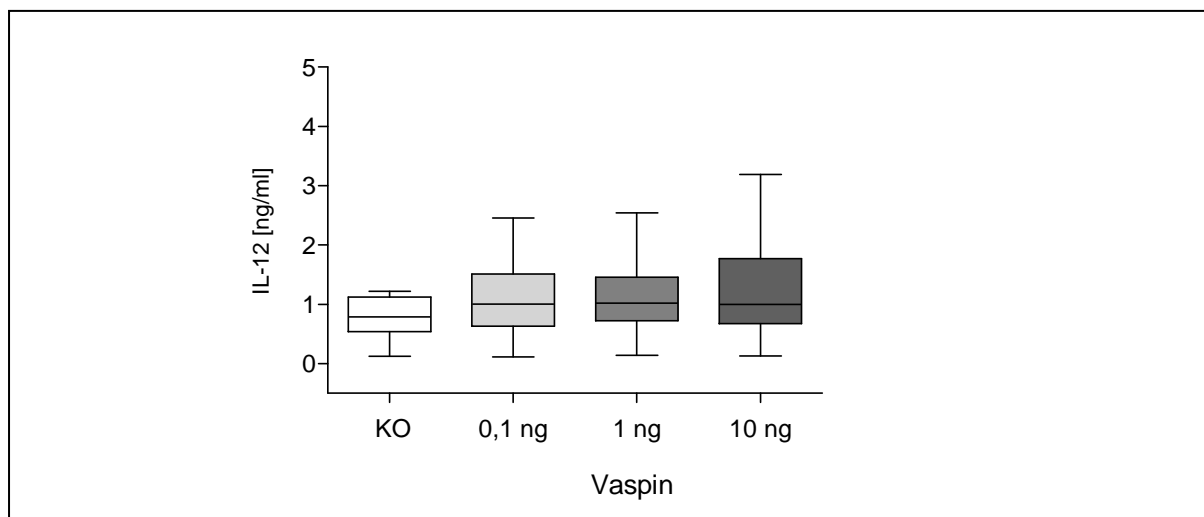


Abb.18: IL-12 Konzentration in Kulturüberständen Vaspin+LPS-stimulierter DCs und nur LPS-stimulierter DCs (=Kontrolle/KO). Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) zur Reifung, wobei nach 24-stündiger Inkubation die Probenentnahme für die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte. Vaspin-Konzentration 0,1;1 bzw. 10 ng/ml; KO LPS-Konzentration 100 ng/ml; n=6; Box Plot mit MW und STABW.

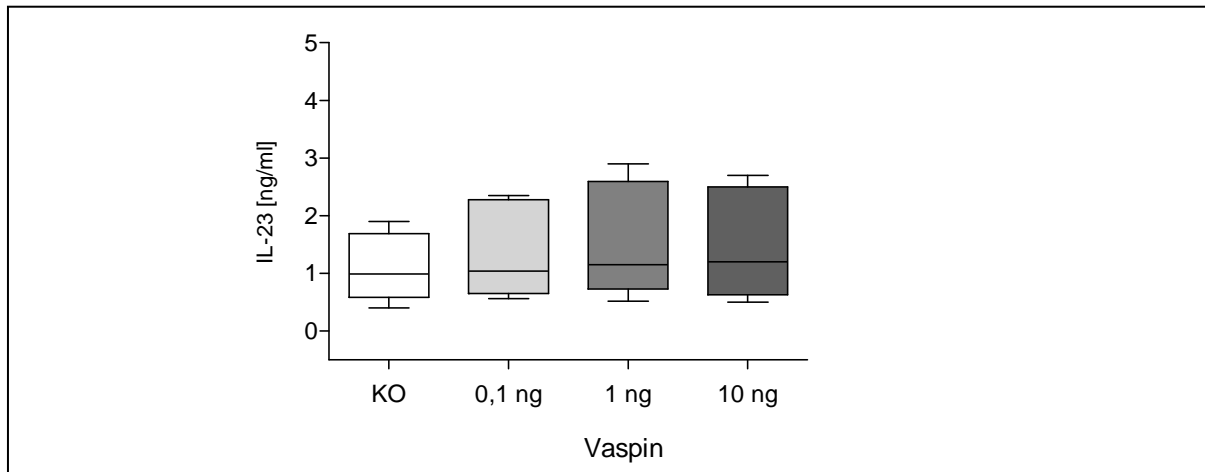


Abb.19: IL-23 Konzentration in Kulturüberständen Vaspin+LPS-stimulierter DCs und nur LPS-stimulierter DCs (=Kontrolle/KO). Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) zur Reifung, wobei nach 4-5-stündiger Inkubation die Probenentnahme für die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte. Vaspin-Konzentration 0,1; 1 bzw. 10 ng/ml; KO LPS-Konzentration 100 ng/ml; n=6; Box Plot mit MW und STABW.

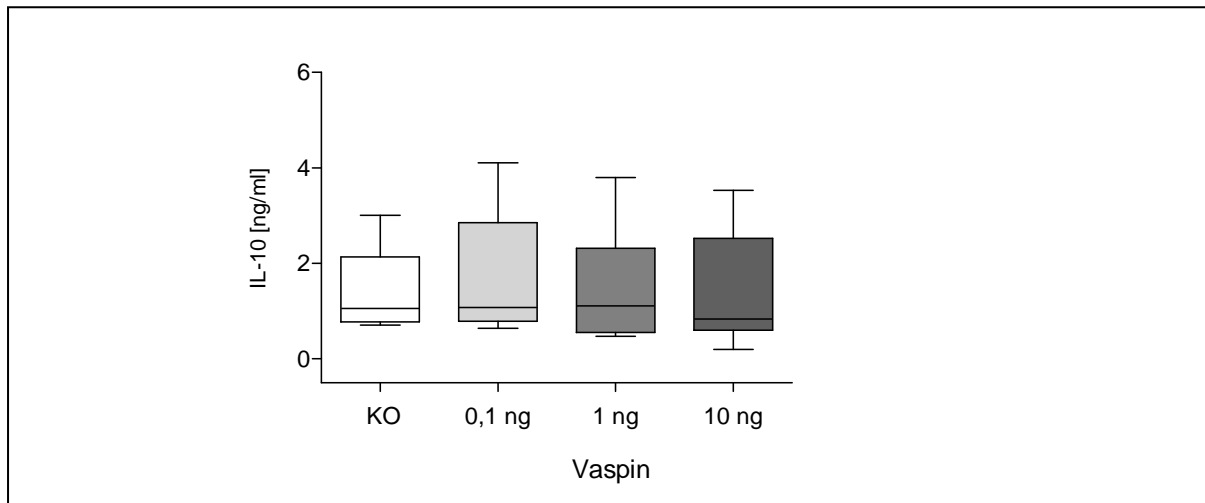


Abb.20: IL-10 Konzentration in Kulturüberständen Vaspin+LPS-stimulierter DCs und nur LPS-stimulierter DCs (=Kontrolle/KO). Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden 4 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Die generierten DCs wurden mit Vaspin in 3 verschiedenen Konzentrationen für 2 h präinkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) zur Reifung, wobei nach 24-stündiger Inkubation die Probenentnahme für die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte. Vaspin-Konzentration 0,1; 1 bzw. 10 ng/ml; KO LPS-Konzentration 100 ng/ml; n=6; Box Plot mit MW und STABW.

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen der Zeitpunkt der Zugabe des Vaspins verändert wurde. So erfolgte eine 24 stündige Präinkubation unreifer DCs mit Vaspin bevor die Zellen mit LPS stimuliert wurden und eine zeitgleiche Zugabe von Vaspin und LPS. Jedoch konnten hier keine Unterschied im Vergleich zur 2 stündigen Präinkubation in der Zytokinsekretion der Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigte Vaspin keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierte Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12 und IL-23.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Rolle des Adipokins Vaspin in der Pathogenese der Psoriasis untersucht. Adipokine erlangten in den letzten Jahren immer größere Bedeutung, da sie in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie z.B. Adipositas gebracht werden. Adipositas wird als eine Begleiterkrankung der Psoriasis diskutiert, sodass möglicherweise die Adipokine auch im Rahmen der Psoriasis- Pathogenese eine Rolle spielen könnten. Da dem Vaspin in der Literatur eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wurde, stellte es ein interessantes Target für Untersuchungen im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese dar. Zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit existierten allerdings nur wenige Daten zum Vorkommen von Vaspin in der Haut, wobei ein Nachweis auf Proteinebene noch nicht publiziert war. Abbildung 21 veranschaulicht die Vorgehensweise im experimentellen Teil der Arbeit, wobei zunächst ein Vergleich der Serumkonzentration von Psoriatikern und gesunden Probanden vorgenommen wurde. Weiterhin erfolgte der Nachweis von Vaspin in der Haut sowie in vitro Versuche zum Einfluss von Vaspin auf dendritische Zellen.

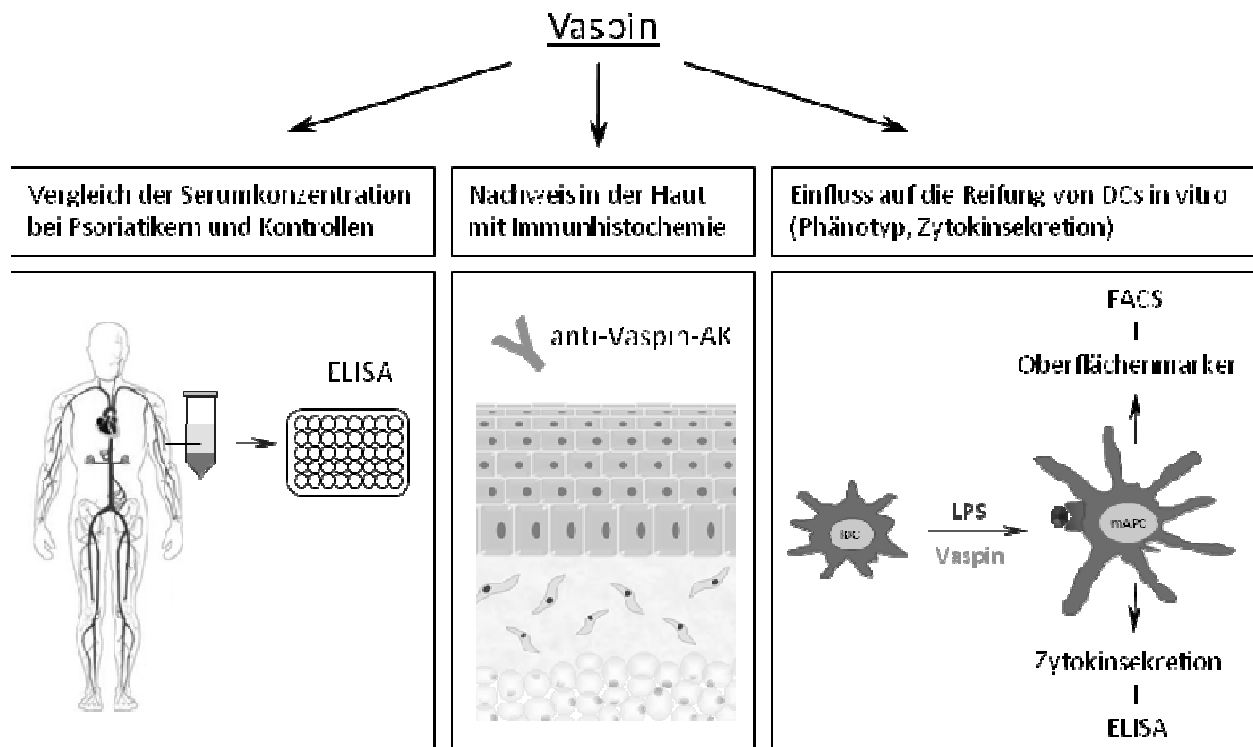


Abb. 21: Schwerpunkte des experimentellen Teils der Arbeit. Quelle Figur links: <http://www.fotosearch.de/illustrationen/zirkulierend-system.html>

4.1. Vergleich der Serumkonzentration von Vaspin in Psoriatikern und Kontrollen

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Serumwerte für Vaspin korrelieren mit literaturbekannten Daten, die Konzentrationen des Adipokins zwischen ca 0,1 und 100 ng/ml dokumentierten [TÖNJES et al., 2010; YOUN et al., 2008]. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Nicht-Psoriatiker eine positive Korrelation zwischen Serum-Vaspinkonzentration und BMI, die auch in der Literatur beschrieben wurde [YOUN et al., 2008]. Demgegenüber konnte in der Gruppe der Psoriatiker keine derartige Korrelation ermittelt werden. Für die Untersuchung auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Psoriatikern und Kontrollen erfolgte eine Unterteilung gemäß der Gewichtsklassifikation (Europa, USA) nach Normalgewicht (BMI 18,5 - 24,99), Übergewicht bzw. Präadipositas (BMI 25,0 - 29,99) und Adipositas (BMI $\geq 30,0$) [WHO homepage, http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html]. Im Ergebnis betrug die Gruppengröße $n=7$, $n=7$ und $n=13$. Angesichts dieser kleinen Populationen sollte in weiteren Experimenten die Personenzahl erhöht werden, um eventuelle Streuungen besser auszugleichen.

Unter Verwendung des Mann-Whitney Tests konnte im Bereich des Normalgewichts (BMI <25) ein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentration von Vaspin zwischen Psoriatikern und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dabei weicht der Mittelwert der Psoriatiker um ca. eine Größenordnung von dem der Kontrollgruppe nach oben ab. Von den 7 untersuchten Probanden befanden sich 4 unter Systemtherapie (Cyclosporin, 2x Acitretine, Methotrexat). Die höchste Vaspin-Serumkonzentration ist einer Person ohne Systemtherapie zuzuordnen, so dass hier zunächst nicht auf eine Korrelation zwischen Systemtherapie und hoher Vaspin-Serumkonzentration zu schließen ist. Bis auf zwei Ausnahmen lag der PASI-Wert in der Gruppe der Psoriatiker mit BMI <25 unter 2 und war eher gering. Die hohen Vaspin-Konzentrationen im Serum scheinen somit nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren. Auch im Rahmen von systemischer Sklerose und systemischem Lupus erythematoses (SLE) gab es keine Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und der Serumkonzentration von Vaspin [OZGEN et al., 2011].

Auffallend ist in der Gruppe mit BMI <25 der hohe Anteil an Frauen (7 von 8 Personen). Literaturbekannte Daten beschreiben eine geschlechtsabhängige Regulation des Adipokins mit höheren Vaspin-Konzentrationen bei den Frauen [SEEGER et al., 2008]. Es wurde hier ein möglicher Einfluss von Östrogenen diskutiert, welcher zu gesteigerten Vaspin-Werten führt [SEEGER et al., 2008].

Interessanterweise wurde für das Adipokin Leptin ein solcher Östrogen-induzierter Anstieg bereits in der Literatur beschrieben [SHIMIZU et al., 1997]. Möglicherweise ist dieser geschlechtsspezifische Unterschied bei den Psoriatikern noch ausgeprägter als bei gesunden Individuen. Zukünftige Versuche sollten darauf ausgerichtet sein, den Anteil an männlichen Probanden in diesem Gewichtsbereich zu erhöhen.

Für den Gewichtsbereich mit Präadipositas und Adipositas konnten zwischen Psoriatikern und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Vaspin-Serumkonzentration ermittelt werden. Dabei differierten die Mittelwerte der Gruppen nur wenig, wobei die der Psoriatiker niedriger waren. Im Ergebnis lässt sich somit ableiten, dass die Psoriasis bei einem BMI über 25 sich nicht signifikant auf die Konzentration von Vaspin im Serum auswirkt. Bei einer Erhöhung der Probandenzahl wäre auch eine Unterteilung von weiblichen und männlichen Individuen interessant, um möglicherweise geschlechtsspezifische Unterschiede aufzudecken.

Von JEONG et al. wurde eine Abhängigkeit der Serumkonzentration des Vaspins von der Nahrungsaufnahme beobachtet [JEONG et al., 2010]. Die höchsten Vaspin-Werte wurden morgens, zwei Stunden vor dem Frühstück detektiert. Generell waren die preprandialen Konzentrationen des Adipokins höher als die postprandialen. Die Werte schwankten um einen Faktor von 2,5 [JEONG et al., 2010]. Da diese Publikation erst nach Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit erschien, wurde dieser Einflussfaktor nicht berücksichtigt, sollte jedoch bei zukünftigen Blutentnahmen bedacht werden.

4.2. Nachweis der Vaspinexpression in Hautbiopaten

4.2.1. Nachweis von Vaspin mRNA mittels RT- und real time PCR

Unter Verwendung der real time PCR galt es zunächst, Vaspin auf mRNA Ebene in Hautbiopaten nachzuweisen und ein Protokoll für die Quantifizierung der Vaspin-Expression in nachfolgenden Versuchen zu erarbeiten. Die real time PCR ist eine gut etablierte, präzise und sensitive Methode zur Quantifizierung der Genexpression [WONG & MEDRANO, 2005; HEID et al., 1996; LOCKEY et al., 1998]. Der überwiegende Teil möglicher methodischer Fehler resultiert daher nicht aus der PCR selbst, sondern vielmehr aus der initialen Probenaufarbeitung von der Gewinnung der Biopate bis zur Synthese der cDNA [RAWER, 2005; BUSTIN, 2000]. Für die RNA-Isolierung wurde ein Protokoll auf Basis des TRIZOL[®] Reagenz verwendet. Hierbei wird das Hautbiopat im

TRIZOL[®] Puffer durch Ultraschall zerkleinert und homogenisiert. Die resultierende RNA Lösung wurde mittels Absorption bei 260 und 280 nm spektrophotometrisch zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit vermessen. Dabei wurden proteinogene Verunreinigungen festgestellt, die durch eine Aufreinigung der RNA Proben mittels RNeasy Kit beseitigt werden konnten. Durch die stark denaturierenden Reagenzien des Kits konnten die möglicherweise aus dem Gewebe freigesetzten RNasen denaturiert werden, was dem Abbau von RNA entgegenwirkte. Das ausgewählte Verfahren weist eine hohe Standardisierung auf, was im Hinblick auf eine reproduzierbare Isolierung der RNA sehr wichtig erschien. Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280nm konnte signifikant verbessert werden und lag nach der Aufreinigung über 1,9 sodass für die nachfolgende reverse Transkription eine qualitativ hochwertige RNA Lösung zur Verfügung stand. Zu beachten war weiterhin, dass die reverse Transkriptase sensitiv ist gegenüber Salzen, Alkoholen oder Phenolen die von der RNA Isolierung zurückbleiben [FREEMAN et al., 1999]. Auch aus diesem Grund erschien die Reinigung der RNA Proben absolut vorteilhaft. Die im Ergebnis der reversen Transkription erzeugte cDNA diente in einer 1:3 Verdünnung als Template für die nachfolgende Amplifikation der RPS26- sowie Vaspin-Sequenz.

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative real time PCR nach einem zwei-Schritt Protokoll durchgeführt, wobei reverse Transkriptionsreaktion und real time PCR in getrennten Gefäßen abliefen. Dies erlaubte die Durchführung verschiedener PCR Assays unter Verwendung von Verdünnungen einer einzigen cDNA. Es wurde gezeigt, dass Daten von zwei Schritt real time PCRs gut reproduzierbar sind [WONG et al., 2005]. Unter Verwendung des in der Arbeitsgruppe etablierten PCR Protokolls für die Amplifikation der RPS26 Sequenz wurden mittels Schmelzkurvenbestimmung und DNA-Gel keine unspezifischen Nebenprodukte detektiert. Demgegenüber zeigten sich in der Amplifikation des Vaspin-Fragmentes nach Auswertung der Schmelzkurve sowie des DNA-Gels unspezifische Nebenprodukte wie Primerdimere (s. Abb. 9, C).

Unter der Annahme, dass unter Verwendung einer geringeren Primerkonzentration auch weniger Primerdimere entstehen, konnte bei Verwendung einer geringeren Primerkonzentration die spezifische Produktbildung in der Vaspin-PCR zum Teil verbessert werden. Den Durchbruch brachte hier jedoch die Anwendung eines sog. „touch down“ Verfahrens, indem die Annealing Temperatur zunächst noch knapp über der Schmelztemperatur der Primer lag. Im Ergebnis waren weder Primerdimere noch sonstige unspezifische Nebenprodukte nachzuweisen.

Die Möglichkeit Primerdimere über die Manipulation der Schmelztemperaturen zu eliminieren wurde bereits in der Literatur beschrieben und stellt einen Vorteil des zwei Schritt PCR Protokolls unter Verwendung von DNA-bindenden Farbstoffen wie SYBR Green dar [WONG et al., 2005].

Es konnte für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben Vaspin auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Das neu etablierte Protokoll für die Amplifikation der Vaspin Sequenz kann in zukünftigen Versuchen zur Quantifizierung der Expression herangezogen werden.

4.2.2. Histochemischer Nachweis von Vaspin in Kryoschnitten der Haut und seine mögliche Rolle im gestörten Desquamationsprozess der Psoriasis

Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers konnte Vaspin auf Proteinebene in allen untersuchten Hautproben, sowohl gesunden Kontrollen als auch psoriatischen Läsionen, in der Epidermis und im subkutanen Fettgewebe nachgewiesen werden (s. Abb. 10 und 11). Bezüglich der Proteinexpression von Vaspin in der Haut gab es zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Dissertation noch keine Veröffentlichungen. Somit konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig ein Nachweis von Vaspin in der Haut, speziell in der Epidermis, auf Proteinebene erbracht werden. Es konnte somit erstmals dokumentiert werden, dass auch Keratinozyten Vaspin produzieren.

Die Eignung des verwendeten Vaspin-AK wurde zunächst im subkutanen Fettgewebe, in dem Vaspin bereits mehrfach nachgewiesen wurde, getestet. Eine Detektion des Adipokins erfolgte im Randbereich der Fettzellen. Durch Kontrollen konnten unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden. Innerhalb der psoriatischen Hautproben fällt die relativ homogene Färbung, d.h. homogene Verteilung des Vaspin-Antikörpers in der Schicht der Epidermis auf, während in den Schnitten der gesunden Haut eine intensivere Anfärbung im Bereich des Stratum granulosum zu verzeichnen war. Hieraus kann auf eine höhere Vaspinkonzentration in dieser Epidermisschicht geschlossen werden. Eine schlüssige Erklärung für den beobachteten Unterschied kann darin begründet liegen, dass das Stratum granulosum in der Regel in psoriatischen Läsionen nicht ausgebildet wird. Folglich ergibt sich hier auch keine stärkere Anfärbung. Durch TOULZA et al. konnten in verschiedenen Schichten der Epidermis ebenfalls Unterschiede in der Vaspin-Expression, allerdings auf RNA Ebene, festgestellt werden. Durch real time PCR wurde gezeigt, dass es spezifisch exprimiert wird durch granuläre Keratinozyten insbesondere der distalen Hautschicht [TOULZA et al., 2007].

Die Autoren schlussfolgerten, dass Vaspin eine Rolle in der Regulation der komplexen Balance zwischen verschiedenen Proteasen und deren Inhibitoren, welche im Desquamationsprozess aktiv sind, spielen könnte [TOULZA et al., 2007].

Es ist bekannt, dass verschiedene Proteasen in den Desquamationsprozess involviert sind und zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut, u.a. durch Aktivierung und Inaktivierung von Abwehrmolekülen beitragen [MEYER-HOFFERT, 2009]. Die immense Bedeutung der regulierten Proteolyse in Epithelien durch Proteasen und korrespondierende Inhibitoren wird insbesondere im Rahmen verschiedener Erkrankungen deutlich [MEYER-HOFFERT, 2009]. Beispielsweise führt ein Defekt im SPINK-5 Gen des Serinprotease-Inhibitors LEKTI zum Netherton Syndrom. Mutationen im Gen von Cathepsin C sind assoziiert mit dem Papillon-Lefevre Syndrom und eine Cathepsin L Defizienz wurde in Zusammenhang mit einer gestörten Fellbildung in Mäusen gesehen, um nur einige Beispiele zu nennen [ZEEUWEN, 2004].

Proteasen können endogen in der Haut exprimiert werden wie z.B. Kallikreine, sie können von infiltrierten Zellen wie Neutrophilen stammen wie z.B. Proteinase 3 oder exogenen Ursprungs sein, von Mikroorganismen oder Allergenen. Basierend auf ihrer proteolytischen Domäne werden Proteasen eingeteilt in Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat-, Glutamat- und Metallo-Proteasen [MEYER-HOFFERT, 2009]. Insbesondere Serin-Proteasen scheinen in die epidermale Barrierehomöostase involviert zu sein [MEYER-HOFFERT, 2009]. Eine Reihe von Protease-Inhibitoren schützen die Haut vor diesen Proteasen. Abbildung 22 gibt einen Überblick über relevante Proteasen und deren Inhibitoren in der Haut.

Zielstrukturen von Proteasen in der Haut schließen Strukturproteine wie Filaggrin, Zytokine und Rezeptoren ein. Eine proteolytische Modifizierung dieser Proteine trägt zu physiologischen Prozessen wie der Desquamation aber auch zur inflammatorischen Antwort in pathologischen Prozessen bei [MEYER-HOFFERT, 2009]. Einige Proteasen regulieren wiederum die Balance zwischen Protease und korrespondierendem Inhibitor in der Haut. Es ist von genereller Wichtigkeit zu verstehen, dass die Ziel-Proteine nicht einfach nur durch proteolytische Spaltung abgebaut werden, sondern proteolytische Prozessierung darauf abzielt, die Funktion eines Proteins zu modifizieren. Das kann entweder durch Aktivierung, Inaktivierung oder Modifizierung erfolgen [MEYER-HOFFERT, 2009].

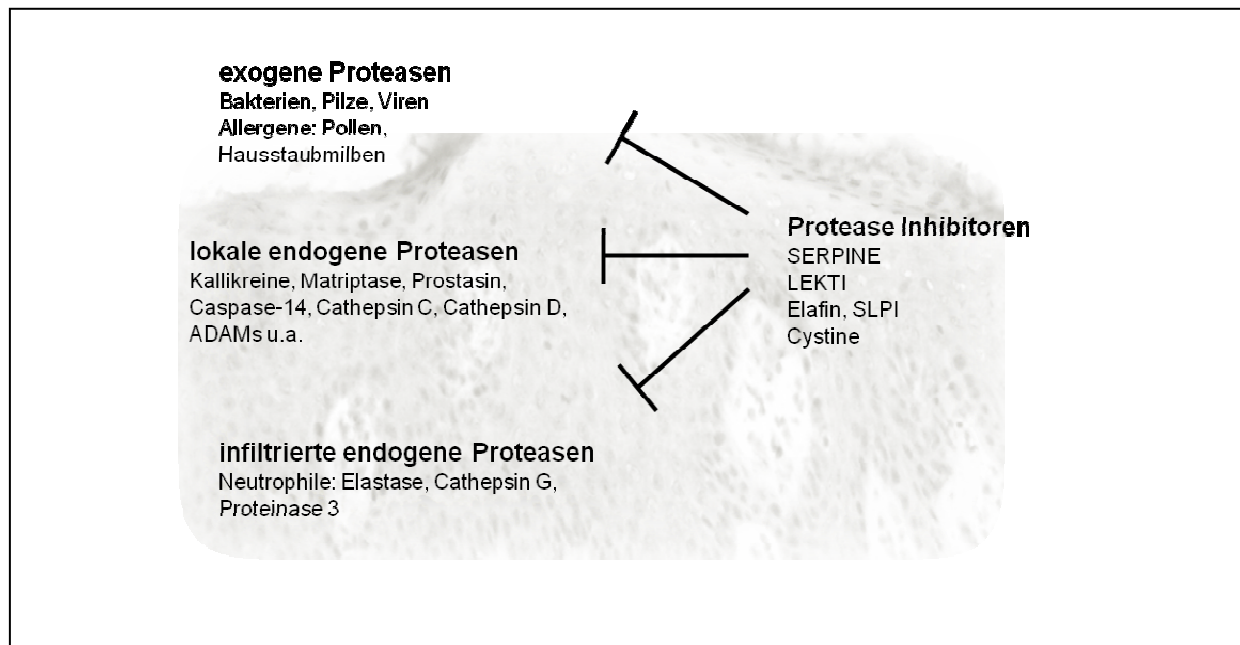


Abb. 22: Proteasen verschiedenen Ursprungs in der Haut; endogen exprimiert durch ortsansässige Zellen der Haut, gebildet durch infiltrierte körpereigene Zellen und exogen eingebracht durch Mikroorganismen oder Allergene. Verschiedene Inhibitoren schützen die Haut vor diesen Proteasen. modifiziert nach Meyer-Hoffert 2009

Das spezifische Differenzierungsprogramm der geschichteten Haut benötigt ein spezialisiertes proteolytisches System um die Korneozyten voneinander zu lösen ohne einen Barrieredefekt hervorzurufen. Die histologische Architektur und Funktion der Epidermis hängt von einer gut kontrollierten Balance zwischen Keratinozyten-Proliferation und -Differenzierung ab. Diese Balance ist in der Psoriasis gestört, wobei ein erhöhter epidermaler turn over zu beobachten ist. Die Abbildung 23 gibt ein vereinfachtes Schema des Aufbaus der Epidermis in psoriatischen Läsionen im Vergleich zu gesunder Haut wieder. Zu erkennen ist der gestörte Differenzierungsprozess in der psoriatischen Epidermis ohne Stratum granulosum sowie der gestörte Desquamationsprozess mit Parakeratose.

Die verhornten Zellhüllen des Stratum corneum, welche während der terminalen Phase der Keratinozytendifferenzierung durch Transglutaminase-vermittelte Vernetzung verschiedener Strukturproteine und Lipide aneinandergesetzt werden, übernehmen einen großen Teil der Barrierefunktion (s. Abb. 23 linker Teil) [ZEEUWEN, 2004]. Es entsteht eine unlösliche Schicht auf der Oberfläche von epidermalen Korneozyten, so dass die Haut vor Wasserverlust, mechanischen Schäden, Krankheitskeimen Allergenen u.a. geschützt ist.

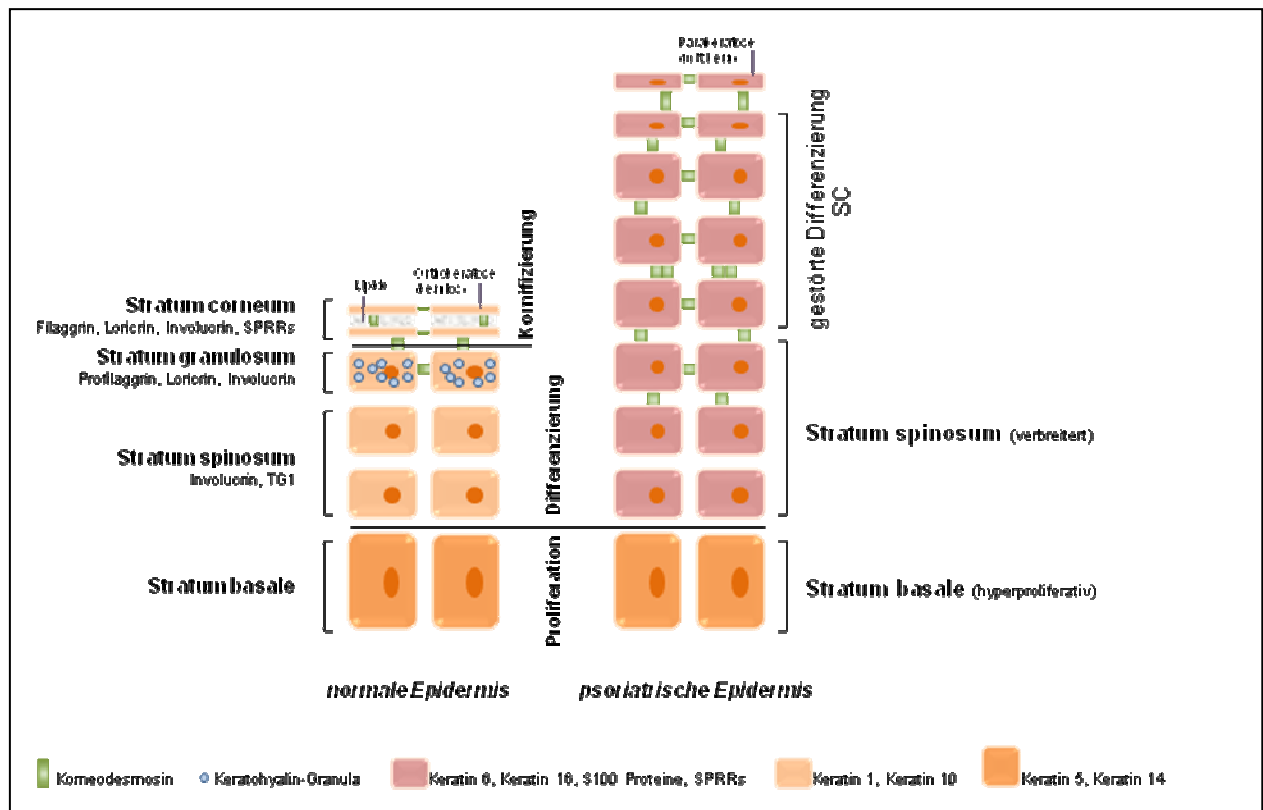


Abb. 23: Links: Physiologischer Aufbau der Epidermis mit Lokalisation relevanter Proteine; Proliferation im Stratum basale, Differenzierungsprozess vom Stratum spinosum bis zum Stratum granulosum, das Stratum corneum ist kernlos und beinhaltet Lipidkomponenten sowie Korneodesmosomen. Rechts: Aufbau psoriatisch veränderter Haut mit gestörtem Differenzierungsprozess und Parakeratose. (SC = Stratum corneum).
modifiziert nach BOWCOCK & KRUEGER 2005.

Im Rahmen der Hautregeneration ist eine gewisse kontinuierliche Abschilferung (Desquamation) des Stratum corneum physiologisch und verläuft in der Regel unbemerkt. Eine proteolytische Kaskade führt zum Desquamationsprozess und jede Änderung in ihrem Ablauf kann in abnormaler Desquamation resultieren, welche wiederum eine lokale Inflammation hervorrufen kann. Während der Entzündung gelangen exogene Proteasen in die Haut entweder von außen durch Mikroorganismen, Allergene u.a. oder werden durch infiltrierte körpereigene Zellen freigesetzt, insbesondere von Neutrophilen. Darüberhinaus werden viele inflammatorische Zytokine und Rezeptoren durch proteolytische Prozessierung aktiviert, welche den inflammatorischen Prozess weiter unterhalten.

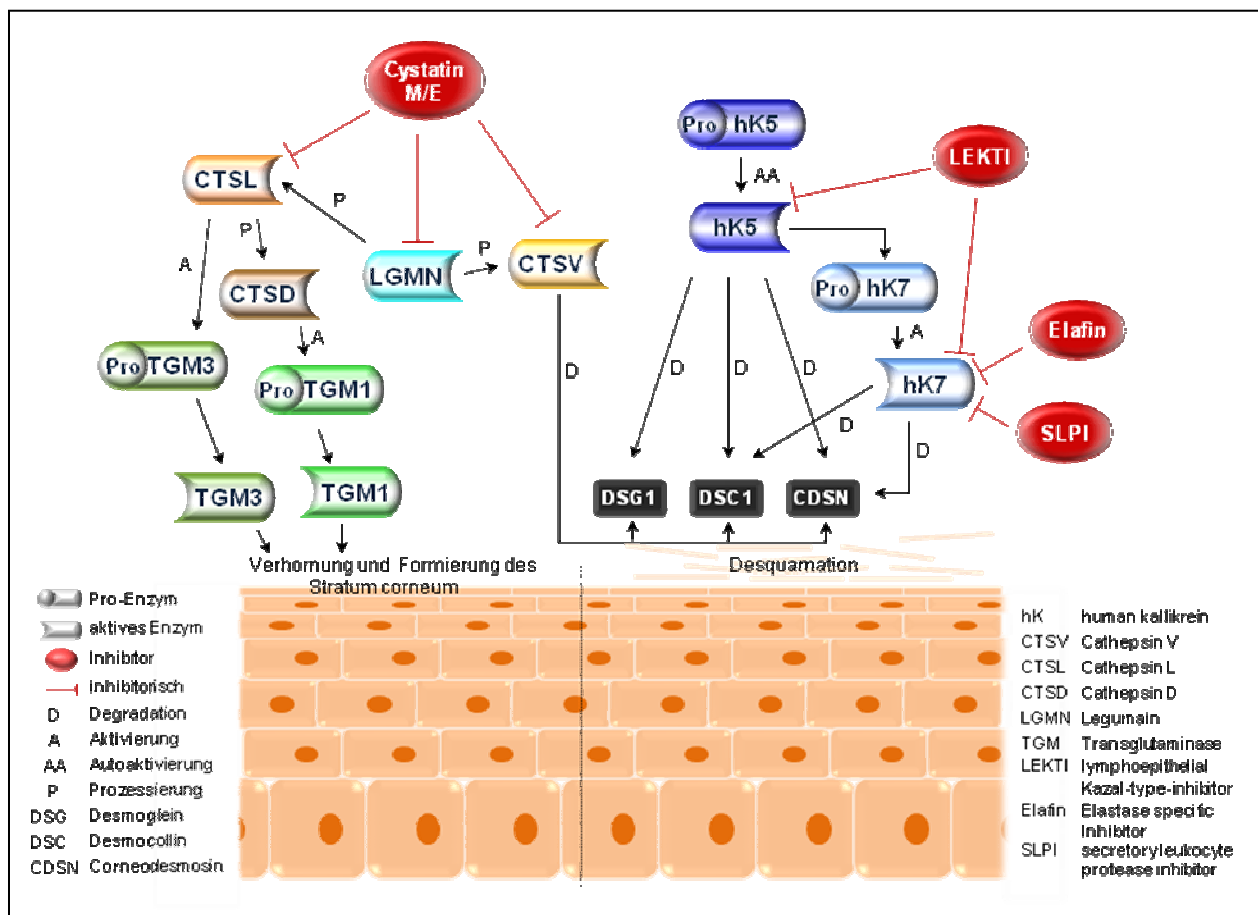


Abb. 24: Links: Formierung des Stratum corneum durch Transglutaminase-vermittelte Vernetzung verschiedener Strukturproteine und Lipide, übergeordnete Regulation durch Cathepsine und Legumain sowie den Inhibitor Cystatin M/E. Rechts: Desquamationsprozess durch Kallikreine und Cathepsin V, eine Regulation der proteolytischen Aktivität erfolgt durch Inhibitoren (LEKTI, Elafin, SLPI). modifiziert nach ZEEUWEN et al. 2009, CAUBET et al. 2004 und BORGONO 2004

Corneodesmosomen sind spezialisierte Desmosomen, welche die Korneozyten im Stratum corneum zusammenhalten. Sie setzen sich zusammen aus der Cadherin-Familie extrazellulärer Transmembran-Glykoproteine, Desmoglein und Desmocollin sowie Corneodesmosin. Eine Mischung aus Serin-, Cystein- und Aspartat-Proteasen werden während der Desquamation in den Extrazellularraum des Stratum corneum sekretiert um den Abbau der Corneodesmosomen zu ermöglichen [CAUBET et al., 2004]. Nach einem Modell von CAUBET et al. werden inaktive Protease-Präkursoren (Proenzyme/Zymogene) durch limitierte Proteolyse aktiviert und durch eine komplementäre Mischung aus Protease-Inhibitoren reguliert (s.Abb. 24) [CORK et al., 2009].

Verschiedene experimentelle Befunde lassen schlussfolgern, dass Kallikreine (KLKs) im Mittelpunkt einer proteolytischen Kaskade zum Abbau der Corneodesmosomen im Desquamationsprozess stehen. Einerseits werden eine Reihe von Kallikreinen in verschiedenen Geweben koexprimiert, andererseits gibt es eine gemeinsame transkriptionelle Regulation [YUSEF & DIAMANDIS, 2002]. Humane Gewebe-Kallikreine oder Kallikrein-verwandte Peptide sind die größte Familie von Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnlichen sekretierten Serinproteasen. Unter physiologischen Bedingungen werden in der Haut 8 KLKs (hK1, hK4, hK6, hK8, hK9, hK10, hK13, hK14) exprimiert, von denen hK5, hK7, hK8 und hK14 die meist bedeutsamsten sind [MEYER-HOFFERT, 2009; BORGÑO et al., 2007]. Auf Proteinebene wurden hK6, hK8, hK10, hK11, hK13 und hK14 im Stratum corneum nachgewiesen [BORGÑO et al., 2007]. Untersuchungen zur Enzymaktivität im Stratum corneum zeigten, dass die detektierte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität dem hK7 zugeschrieben werden kann, während die Hälfte der Trypsin-ähnlichen Aktivität durch hK5, die restliche Trypsin-ähnliche Aktivität hauptsächlich von hK14 vermittelt wird [BRATTSAND et al., 2005]. Eine Aktivierung der Präkursoren der Kallikreine durch limitierte Proteolyse durch andere Familienmitglieder wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [BRATTSAND et al., 2005]. So kann hK5 den Präcursor von hK7 sowie hK14 aktivieren und darüberhinaus autokatalytisch auch seinen eigenen Präcursor. Es könnte somit eine Schlüsselrolle in der proteolytischen Kaskade im Stratum corneum spielen [BRATTSAND et al., 2005]. In Proben von Psoriasis-Patienten wurde interessanterweise eine gemeinsame Induktion von hK6 und hK9 beschreiben [GAN et al., 2000]. Weiterhin wird eine epidermale Überexpression von hK7 in Zusammenhang gesehen mit pathologischen Hautveränderungen, welche eine epidermale Verdickung, Hyperkeratose, dermale Inflammation und starken Pruritus beinhalten [MEYER-HOFFERT, 2009].

Aus einer von LI et al. durchgeführten Expressionsanalyse bezüglich dermalen Proteasen geht hervor, dass in psoriatischen Hautläsionen vor allem Lactoferrin und Marapsin um ca 1 Größenordnung stärker exprimiert werden im Vergleich zu gesunder Haut [LI et al., 2009]. Laktoterrin ist eine wichtige Komponente der Immunabwehr und arbeitet als potentes anti-inflammatorisches Protein an lokalen Stellen der Entzündung. Auf Grund experimenteller Daten wurde auf eine potentielle Rolle dieser Protease in der Regulation der Immunität der Haut geschlossen, wobei es möglicherweise über Rezeptoren auch Einfluss auf Keratinozytenzellen nimmt. Es wird in größeren Mengen auch in Neutrophilen produziert, von denen es während der Entzündung freigesetzt wird

um zur antimikrobiellen Aktivität beizutragen [CONNELLY, 2001]. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, dass psoriatische Läsionen für ihre hohe Resistenz gegenüber bakteriellen, viralen und durch Pilze verursachte Infektionen sind [LI et al., 2009].

Die Trypsin-ähnliche Serin-Protease Marapsin ist hoch spezifisch und begrenzt auf mehrschichtiges Plattenepithel, wobei eine konstitutive Marapsin-Expression im Menschen nur in nicht verhornenden Epithelien wie Ösophagus und Larynx beschrieben wurde [LI et al., 2009]. In der Haut wurde es nur während der Hyperplasie und Hyperproliferation wie in der Psoriasis detektiert. Es wurde angenommen, dass Marapsin-Expression in der Haut eine allgemeine Antwort auf die Keratinozyten Hyperplasie ist, da alle Zytokine, die Marapsin induzieren (IL-19, IL-20, IL-22, und IL-24) auch Hyperplasie induzieren [LI et al. 2009]. Details über die physiologische Rolle von Marapsin sind derzeit noch nicht bekannt [LI et al., 2009].

Verstärkt exprimiert wurden in psoriatischer Haut weiterhin die Kallikreine hK13, hK6, hK8 und hK10 und Otubain-2, eine Cysteinprotease, welche Proteine deubiquityliert [LI et al., 2009]. Auch von GAN et al. wurde beschrieben, dass einige der Proteasegene in psoriatischen Läsionen höhere Expressionslevel zeigen als in gesunder Haut des selben Patienten [GAN et al., 2000].

Protease Inhibitoren regulieren die proteolytische Aktivität der Enzyme und tragen somit zur Aufrechterhaltung der protektiven Barrierefunktion der Haut bei. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Protease und korrespondierendem Inhibitor kann zur Entzündung und zur Ausprägung der typischen Rötung, Schuppung und Pruritus führen [Meyer-Hoffert, 2009]. Neben der Überexpression der Proteasen kann auch eine Minderexpression der relevanten Protease-Inhibitoren zur Imbalance der komplexen proteolytischen Kaskaden in der Haut führen und möglicherweise zur Pathogenese der Psoriasis beitragen. Unter der Annahme, dass auf Grund der weniger intensiven Färbung in der obersten Hautschicht der histologischen Schnittpräparate der Psoriatischer die Konzentration von Vaspin geringer ist, wäre eine Imbalance bestimmter proteolytischer Prozesse denkbar. Die in der vorliegenden Arbeit detektierte starke Expression von Vaspin in den gesunden Hautbiopsaten lässt auf eine wichtige physiologische Rolle in den Stoffwechselprozessen der Haut schließen. Unter der Annahme, dass Vaspin ein SERPIN mit inhibitorischer Aktivität gegenüber Proteasen ist, könnte es in den epidermalen Desquamationsprozess mit seinen verschiedenen Proteasen einbezogen sein. Dies setzt jedoch einen Interaktionspartner des Vaspins voraus. Wird davon ausgegangen, dass Vaspin über die RCL mit einer Protease

interagiert, wären hier auf Grund der Aminosäuren-Zusammensetzung der RCL am ehesten Proteasen mit Spezifität für ungeladene, kleine Aminosäureseitenketten prädestiniert für Interaktionen. Dies begründet sich darin, dass die RCL überwiegend aus ungeladenen und nicht aromatischen Aminosäuren besteht (Aminosäuresequenz ab Position 363 = RGTEGAAGTGAQTLPM) [HIDA et al., 2005]. Geladene Reste finden sich lediglich in der Randregion der RCL (s. Abb. 25 B). Ob diese bei der recht komplexen Struktur des Vaspins für eine Substratbindung durch die Protease wirklich zur Verfügung stehen, bleibt fraglich. Vor diesem Hintergrund würden Kallikreine mit ihrer Präferenz für basische Aminosäureseitenketten im Zentrum der Substratbindungsregion als Interaktionspartner nicht in die engere Wahl kommen.

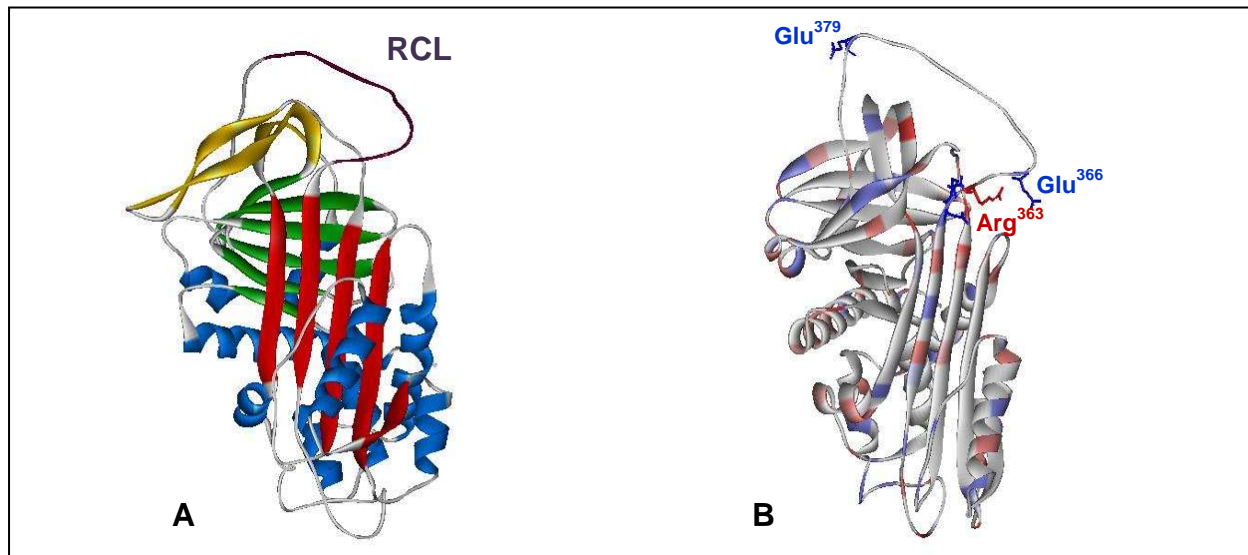


Abb. 25: Proteinstruktur von Vasin, SWISS-MODEL Eintrag Q8IW75, nachbearbeitet mit WebLab ViewerPro

A) 3 β -Faltblätter (blau, grün, rot), 9 α -Helices (blau), RCL/reactive center loop (violett)

B) Ladungsverteilung im Molekül, blau = saure Reste, rot = basische Reste

In Bezug auf eine Präferenz für kurze Aminosäureseitenketten wie Glycin, Alanin und Valin wäre zum Beispiel die humane leukocyte elastase (HLE) sowie die Proteinase-3 zu nennen, die von Neutrophilen gebildet werden. Die Infiltration von Neutrophilen ist ein gewöhnlicher pathologischer Prozess der akuten Entzündung. In psoriatischen Plaques ist ein typisches neutrophiles Infiltrat in der Epidermis nachzuweisen. Dabei können Neutrophile zu tausenden in der Haut akkumulieren und deren sekretierte Proteasen aktivieren EGF-Rezeptoren und induzieren die Sekretion von Zytokinen, was den Entzündungsprozess fördert [MEYER-HOFFERT et al., 2004; MEYER-HOFFERT, 2009].

Über die Detektion und Quantifizierung von HLE in psoriatischen Plaques wurde in der Literatur berichtet, wobei die HLE Aktivität mit dem Level der Entzündung korrelierte und nach erfolgreicher Behandlung verschwand. Zusammengefasst sind Neutrophile und deren Proteasen Schlüsselregulatoren während der Entzündung, ein Umstand welcher oft übersehen wird [MEYER-HOFFERT, 2009].

In dem durchgeführten Sequenzvergleich zwischen der RCL des Vaspins und inhibitorischen Regionen verschiedener relevanter Protease-Inhibitoren (s. Abb. 12) zeigte Vaspin sequentiell kaum Gemeinsamkeiten mit den klassischen Kallikrein inhibierenden Domänen des LEKTI (lympho-epithelial Kazal type 5 inhibitor). Zum Inhibitor der humanen Leukozyten Elastase (HLE), SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), und dem inhibitor der Proteinase-3 aus Leukozyten, Elafin (auch skin-derived antileukoprotease = SKALP), zeigte die Vaspin-Sequenz eine Übereinstimmung in 3 Aminosäuren (G, P, M). SLPI ist ein säurestabiler Inhibitor mit starker Affinität für Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Cathepsin G, wobei die für Chymotrypsin und Elastase relevante Substratbindungsstelle bei einem Leucin und Methionin liegt (in Abb. 11 Alignment 3 unterstrichen). Die größte Übereinstimmung der Vaspin RCL wurde mit der inhibitorischen Region des α 1-Antitrypsin (SERPIN A1) detektiert. In der Literatur wird eine 40 % ige Homologie zwischen beiden Proteinen beschrieben [HIDA et al., 2005]. Die von der Protease zu spaltende Bindung im α 1-Antitrypsin liegt zwischen einem Methionin und Serin. Dieser Inhibitor schützt Gewebe vor Enzymen inflammatorischer Zellen, im speziellen vor der neutrophilen Elastase (HLE) [KUSHNER & MACKIEWICZ, 1993], welche eine Präferenz für Val- \downarrow Xaa > Ala- \downarrow Xaa Bindungen besitzt (www.uniprot.org/uniprot/P08246).

Auf Grund der Sequenzhomologie von Vaspin zum SERPIN A1 (α 1-Antitrypsin) wäre eine inhibitorische Funktion gegenüber Enzymen mit Elastase-ähnlicher Spezifität durchaus denkbar. Aus der in Abbildung 10 dargestellten Immunhistochemie konnte abgeleitet werden, dass Vaspin in psoriatischen Läsionen gleichmässig über alle Schichten der Epidermis verteilt ist. Demgegenüber war in gesunder Haut eine höhere Vaspin-Konzentration im Stratum granulosum zu detektieren. Somit könnte es in psoriatisch veränderten Hautarealen zu einer Überschiessenden Aktivität von Proteasen in der Epidermis kommen.

Bezüglich des Interaktionspartners für Vaspin auf Seiten der Protease könnten in vitro Versuche unter Verwendung synthetischer Substrate und ausgewählter relevanter Enzyme näheren Aufschluss über die inhibitorische Aktivität des SERPIN A12 geben.

Eine andere mögliche Funktion des Vaspins wurde von Fu et al. diskutiert. Die Wissenschaftler konnten eine leichte Inhibierung der Phosphorylierung der Proteinkinase Akt detektieren. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Akt-Signalwegs durch Phosphorylierung in Krebszellen erhöht ist und dadurch das Proliferationssignal verstärkt wird. Die Inhibierung des Akt-Signalwegs induziert dagegen eine Apoptose [CROWELL et al., 2007]. Es wurde daher von den Autoren die Möglichkeit eingeräumt, dass Vaspin ein potentieller Tumor Suppressor wie Maspin, ein anderes Mitglied der Serpin Superfamilie, sein könnte [Fu et al., 2009].

4.3. Einfluss von Vaspin auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften von DCs

In der vorliegenden Arbeit wurden dendritische Zellen aus peripherem Blut von gesunden Spenderpersonen generiert. Die aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen zeichnen sich daher durch einfache Gewinnung und gute Handhabung aus. Monozyten sind in Abhängigkeit von externen Stimuli zur Differenzierung in Makrophagen oder dendritische Zellen fähig, welche in vitro durch die Zugabe von Zytokinen induziert werden kann [SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994]. Als Standardmethode zur Generierung dendritischer Zellen wurde ein zwei Schritt Verfahren entwickelt, bei dem zunächst die Inkubation von CD14⁺ Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 über vier bis fünf Tage erfolgt [SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994]. Die hierbei resultierenden unreifen DCs mit hoher Kapazität zur Antigenaufnahme und Prozessierung [ZHOU & TEDDER, 1995] können bei nachfolgender Stimulation mit LPS ausreifen um ihre vollständige T-Zell-stimulatorische Kapazität zu entwickeln [Sallusto & Lanzavecchia, 1994; BANCHEREAU et al., 2000]. Das LPS bindet dabei als Agonist an den Toll-like Rezeptor 4 und aktiviert damit die Sekretion inflammatorischer Zytokine sowie die Expression typischer Oberflächenmarker [KIM et al., 2011]. Literaturbekannte Daten belegen, dass ein Differenzierungsprozess von Monozyten zu DCs auch in vivo erfolgen kann, wobei von RANDOLPH et al. gezeigt wurde, dass Monozyten allein durch transendotheliale Migration zu dendritischen Zellen differenzieren können [RANDOLPH et al., 1998].

4.3.1. Einfluss von Vaspin auf die Differenzierung von Monozyten zu DCs

Die aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten wurden nach 4 tägiger Kultivierung in DC-Medium mit IL-4, GM-CSF und 1 ng/ml Vaspin durchflusszytometrisch auf die Expression relevanter Oberflächenmoleküle untersucht. Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse belegen den Übergang von CD14⁺ Monozyten zu überwiegend CD1a⁺ dendritischen Zellen mit einem Anteil von über 60%. Es konnte eine moderate Expression von MHC II Molekülen detektiert werden. Der Anteil positiver Zellen lag hier bei ca 50%. Die Aktivierungs- bzw. Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 wurden nur von sehr wenigen Zellen exprimiert. Zusammenfassend entsprachen die generierten Zellen einem unreifen DC Phänotyp. Es wurde keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss von Vaspin bezogen auf die Kontrolle detektiert.

4.3.2. Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmolekülen LPS-stimulierter DCs

Um sicherzustellen, dass es sich bei den in den Experimenten verwendeten Zellen um funktionsfähige DCs handelte, wurden die nach dem Standardprotokoll generierten Zellen phänotypisch charakterisiert und funktionell evaluiert. Nach 4 tägiger Kultivierung unter Zusatz von IL-4 und GM-CSF hatten die generierten Zellen den für Monozyten charakteristischen Marker CD14 weitestgehend verloren und exprimierten CD1a. CD1a ist ein Membranprotein, welches früh in der DC Entwicklung exprimiert wird. Funktionales CD1a muss stabilisiert werden durch eingefangene körpereigene Lipide oder von Pathogenen stammenden Lipiden, um CD1 vermittelt T-Lymphozyten zu aktivieren. Im Gegensatz zu MHCII Molekülen ist die Membranexpression von CD1a nicht abhängig von der DC Reifung [GOGOLAK et al., 2007]. Die unreifen DCs wurden durch Zusatz von LPS (100 ng/ml) zur Reifung angeregt. Im Ergebnis konnte ein phänotypischer Wechsel von den runden Monozyten hin zu dendritische Zellen mit den charakteristischen distalen Ausläufern lichtmikroskopisch beobachtet werden. Typischerweise kam es zur Bildung von Clustern. In der durchflusszytometrischen Messung der Oberflächenmarker nach 24 stündiger Stimulation mit LPS exprimierten die DCs in einheitlichen Populationen sowohl den Reifemarker CD83, MHC-II als auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie CD1a auf ihrer Oberfläche (Abb. 15). Die Ausprägung dieser klassischen phänotypischen Eigenschaften durch LPS Stimulation in vitro wurde bereits in der Literatur beschrieben [RADWAN et al., 2010;

KELLEHER & BEVERLEY, 2001]. Die aus Monozyten generierten dendritischen Zellen erfüllten somit die erforderlichen Kriterien, um als funktionale dendritische Zellen bezeichnet werden zu können. Nach einer Präinkubation der unter Punkt 3.4.1. charakterisierten unreifen DCs mit Vaspin in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml für zwei Stunden erfolgte die Zugabe von LPS (100 ng/ml) um die Reifung zu induzieren, wonach die Inkubation für 24 h fortgesetzt wurde. Es konnte bei Zusatz von Vaspin jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression typischer DC-Oberflächenmoleküle im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (s. Abb. 15). Es zeigte sich in allen Proben ein deutlicher Anstieg der Reifemarker CD80, CD83 und CD86 positiven Zellen mit 80%-90% im Vergleich zu unreifen DCs (vgl. Abb 14). Der Anteil an MHCII positiven Zellen stieg im Vergleich zu unbehandelten unreifen DCs auf ca 75% an. Der relativ hohe Anteil an CD1a⁺ und geringe Anteil an CD14⁺ Zellen kann als Hinweis auf die stattgehabte Differenzierung von Monozyten zu DCs interpretiert werden. Auch die Verlängerung der Vaspin-Präinkubationszeit auf 24 h vor LPS Zugabe brachte keine Veränderung der Ergebnisse. Ebenso wirkungslos blieb die 4 tägige Inkubation mit Vaspin bereits auf der Stufe der Monozyten zusammen mit GM-CSF und IL-4. Auch die zeitgleiche Zugabe von Vaspin und LPS zeigte keine Unterschiede bezüglich der DC-Oberflächenmarker.

Die Expression von Reifungs- bzw. Aktivierungsmarkern auf dendritischen Zellen variierte somit nicht mit dem Zeitpunkt der Zugabe des Vaspins. Zusammenfassend hatte Vaspin unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression von Reifemarkern LPS-stimulierter DCs. Jedoch bleibt die Frage offen, ob Vaspin möglicherweise auf andere Stimulationswege, die nicht TLR-vermittelt ablaufen (z.B. Antigen-vermittelt über MHC-Moleküle) einwirken kann.

WANG et al. konnten für Präadipozyten und ausdifferenzierte Adipozyten zeigen, dass Vaspin in den Überstand sekretiert wird und somit ein sekretorisches Protein ist [WANG et al., 2010]. In welchem Ausmaß Vaspin von den Keratinozyten sekretiert wird, lässt sich anhand der histologischen Schnittpräparate (s. Abb. 11) jedoch nicht beurteilen. Unter diesem Aspekt wäre eine Kultivierung von Keratinozyten mit anschließender Konzentrationsbestimmung von Vaspin im Kulturüberstand hilfreich. Damit würde sich ein konkreter Anhaltspunkt für die in den nachfolgenden DC Experimenten zu verwendenden Vaspin Konzentrationen ergeben. Diese wurden in Anlehnung an die publizierten Serumkonzentrationen von Vaspin ausgewählt. Auf Grund der starken Reaktion des Vaspin-Antikörpers ist jedoch eine höhere Konzentration des Adipokins in

der Epidermis per se nicht auszuschliessen. Möglicherweise hätten höhere Konzentrationen von Vaspin in der DC Kultur einen deutlicheren Effekt als unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen.

4.3.3. Einfluss von Vaspin auf die Zytokinsekretion LPS-stimulierter DCs

Die Zytokinproduktion dendritischer Zellen lässt Rückschlüsse über deren Einfluss auf die Immunantwort zu. Daher wurde die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6, IL-12, und IL-23 sowie des antiinflammatorischen IL-10 untersucht. Auf die Wirkungsweise dieser Mediatoren und ihre Bedeutung im Rahmen des Pathomechanismus der Psoriasis wurde bereits in der Einleitung eingegangen.

In der vorliegenden Arbeit konnten in den mit LPS inkubierten Kontrollen alle vier proinflammatorischen Zytokine, aber auch IL-10 mittels ELISA detektiert werden (s. Abb. 15-20). Es ist bekannt, dass die Stimulierung und Reifung von DCs vermittelt durch TLR Agonisten wie LPS assoziiert ist mit einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges, was zur Expression proinflammatorischer Mediatoren führt [KIM et al., 2011]. Nach LPS Stimulation werden folgende Interleukine auf mRNA Ebene sehr stark exprimiert: IL-1 β , IL-1Ra, IL-12p40; moderat exprimiert: IL-1 α , IL-6, TGF β 1; und mäßig exprimiert: IL-12p35, IL-15, TNF α und TNF β [KELLEHER & BEVERLEY, 2001]. Das Zytokin Interleukin-12 wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines kommerziell verfügbaren ELISA-Kits bestimmt, der das biologisch aktive (p70) Heterodimer detektiert. Es war von Interesse, weil es verantwortlich für die DC-vermittelte Generierung einer in der Psoriasis dominierenden proinflammatorischen T_H1 Antwort und die Aktivierung von CTLs sein kann [KIM et al., 2011]. Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für eine Beteiligung in der Pathogenese von Autoimmunität [SEGAL et al., 1997]. IL-6 war als ein Hauptmediator der Immunabwehr von Interesse, da es eine Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten unterstützt und deren chemotaktische Reaktion in Richtung Dermis bzw. Epidermis erhöht [BAKER & FRY, 1992]. IL-23 spielt eine Schlüsselrolle in der peripheren Entzündung indem es T_H17 Zellen zur Produktion von Effektorzytokinen aktiviert [DI CESARE et al., 2009]. Ein Zusammenhang zwischen IL-23 und der Bildung von autoimmunen T-Zellen wird für Psoriasis aber auch rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und Morbus Crohn diskutiert [KAUFMANN, 2005]. Weiterhin war das stark proinflammatorisch wirkende Zytokin TNF α Gegenstand der Untersuchungen. Es ist in entzündeter Haut wie der Psoriasis erhöht und hat einen

Einfluss auf die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung verschiedener Zelltypen [WARE, 2003].

Die proinflammatorische Abwehr ist essentiell für die Bekämpfung von Pathogenen. Umgekehrt ist es absolut notwendig den inflammatorischen Prozess zu limitieren und aufzulösen um Schäden des Organismus zu vermeiden. Deshalb scheint es ein wenig überraschend, dass es in der Haut nur zwei Haupt-antiinflammatorische Zytokine IL-10 und TGF β gibt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die IL-10 Sekretion der Zellkulturen evaluiert. Im Zusammenhang mit der Psoriasis ist es interessant, da IL-10 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1 und T_H17 T-Zellen unterdrückt und die Produktion von zugehörigen proinflammatorischen Zytokinen ebenfalls supprimiert [ASADULLAH et al., 1998; GU et al., 2008]. Es kann somit überschießenden Entzündungsreaktionen, wie sie in der Psoriasis auftreten, entgegenwirken.

Im Mausmodell konnte exogen appliziertes Vaspin die Expression der proinflammatorischen Mediatoren TNF α , Leptin und Resistin in mesenterialen und subdermale WAT unterdrücken [HIDA et al., 2005]. Zusammenfassend zeigte Vaspin in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von TNF α , IL-6, IL-12 und IL-23. Ebenso konnte kein Effekt von Vaspin auf das antiinflammatorisch wirksame IL-10 nachgewiesen werden, welches durch in vitro gewachsene und gereifte DCs in einer kontinuierlichen Weise synthetisiert werden kann [ZHOU & TEDDER, 1995]. IL-12 und IL-10 spielen entgegengesetzte Rollen in der Polarisierung von antigenspezifischen T-Lymphozyten. IL-10 produzierende DCs sind funktionell und phänotypisch inhibitorische akzessorische Zellen und vermeintlich tolerogen [TRINCHIERI, 1993]. Das antiinflammatorische Potential von IL-10 war Anreiz für klinische Tests um mit IL-10 chronisch entzündliche Erkrankungen einschließlich entzündlicher Darmerkrankungen, Rheumatoide Arthritis, and Psoriasis zu behandeln, jedoch mit begrenztem Erfolg [ASADULLAH et al., 2003; JARIWALA, 2007].

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen der Zeitpunkt der Zugabe des Vaspins verändert wurde. Auch eine verlängerte Präinkubationszeit des Vaspins von 24 h sowie 4 Tagen führte nicht zu einer Veränderung der Ergebnisse. Ebenso unwirksam blieb die zeitgleiche Zugabe von Vaspin und LPS. Die in der Zellkultur vorhandenen Vaspin-Konzentrationen orientierten sich an publizierten Vaspin- Serumwerten, welche im Bereich zwischen 0,1 und 100 ng/ml lagen. Fraglich bleibt, welche Konzentration des Adipokins in der Haut tatsächlich vorliegt und auf dendritische Zellen einwirken kann.

Auch in anderen Zellmodellen zeigte Vaspin keinen signifikanten antiinflammatorischen Effekt. Fu et al. testeten die Wirkung von Vaspin auf native und TNF α stimulierte Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) [Fu et al., 2009]. Eine Suppression der TNF α vermittelten Aktivierung proinflammatorischer Signalwege wurde nur für den Akt-Signalweg, wenn auch nicht in signifikantem Ausmaß, detektiert. Auch eine 30 minütige Vorbehandlung mit Vaspin (100 ng/ml; 30 min) erbrachte keine wesentlichen Änderungen der Ergebnisse. Die Autoren postulierten eine mögliche Interaktion von Vaspin mit Elementen des Akt-Signalweges. Es wurde daher die Möglichkeit eingeräumt, dass Vaspin ein potentieller Tumor Suppressor wie Maspin [MCKENZIE et al., 2008], ein anderes Mitglied der Serpin Superfamilie, sein könnte [Fu et al., 2009].

In einem weiteren Zellmodell von Vascular Smooth Muscle Cells (SMCs) hatte Vaspin keinen Einfluss auf den initiierten inflammatorischen Prozess [YAMAWAKI, 2011]. Es konnte jedoch eine Inhibition der TNF α induzierten Expression eines Adhäsionsmoleküls detektiert werden, was auch die nachfolgende Lymphozytenadhäsion einschränkte. Weiterhin wurde eine Suppression der von oxidativem Stress abhängigen NF- κ B Aktivierung diskutiert. Zusammenfassend wurde eine mögliche inhibitorische Rolle des Vaspins in Bezug auf den inflammatorischen Status von vaskulären Smooth Muscle Cells eingeräumt [YAMAWAKI, 2011].

Zur Klärung der Frage, ob Vaspin tatsächlich direkt mit dendritischen Zellen interagieren kann, müsste nach einem Rezeptor für das Adipokin gesucht werden. Hierbei könnten Immunfluoreszenz-Test oder auch die Durchflusszytometrie unter Verwendung spezifischer anti-Vaspin Antikörper zielführend sein. Während die Rezeptoren bzw. Interaktionspartner sowie Signaltransduktionswege anderer bedeutender Adipokine wie Leptin und Adiponektin bekannt sind [WOZNIK et al., 2009; LAGO et al., 2007; KARASTERGIOU & MOHAMMED-ALI, 2010; RABE et al., 2008], gibt es für Vaspin diesbezüglich keine publizierten Daten, was die Diskussion der erzielten Ergebnisse erschwert.

Weiterhin kann diskutiert werden, ob Vaspin möglicherweise auf andere Stimulationswege, die nicht TLR-vermittelt ablaufen (z.B. Antigen-vermittelt über MHC-Moleküle) einwirken kann. Dementsprechend sind andere Stimulatoren als LPS für in vitro Kulturen zu wählen. Weiterhin wären auch Versuche unter einer Co-Stimulation dendritischer Zellen mit Vaspin und pro-inflammatorischen Adipokinen wie Leptin denkbar, um die Funktionsweise des SERPINs näher aufzuklären.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Untersuchungen zur Rolle von Vaspin in der Psoriasis

eingereicht von:

Dr. rer. nat. Kathrin Rall, geb. Stabe

angefertigt an der

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Leipzig

betreut von: Dr. rer. nat. habil. A. Saalbach, Professor Dr. med. J.C. Simon

Monat und Jahr der Einreichung: 01/2012

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Rolle des Adipokins Vaspin in der Pathogenese der Psoriasis untersucht werden. Adipokine erlangten in den letzten Jahren immer größere Bedeutung, da sie in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie z.B. Adipositas gebracht werden. Adipositas wird als eine Begleiterkrankung der Psoriasis diskutiert, sodass möglicherweise die Adipokine auch im Rahmen der Psoriasis- Pathogenese eine Rolle spielen könnten. Es erfolgte ein Vergleich der Serumkonzentrationen von Vaspin in Psoriatikern und gesunden Probanden in Abhängigkeit des BMI. Es wurden *in vitro* Experimente mit kultivierten dendritischen Zellen durchgeführt, um den Einfluss von Vaspin auf die Expression von Oberflächenmarkern und die Sekretion von Zytokinen zu untersuchen. Weiterhin galt es mittels Immunhistochemie, Vaspin in gesunder und psoriatisch veränderter Haut nachzuweisen. Die experimentellen Arbeiten führten zu folgenden Ergebnissen:

In den Serumproben konnte für den Bereich mit einem BMI <25 ein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Vaspin zwischen Psoriatikern und der

Kontrollgruppe detektiert werden. In dem Bereich der Präadipositas (BMI 25-29,99) und Adipositas (BMI >30) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Psoriatikern und Kontrollen. Auf Seiten der Kontrollen korrelierten die Vaspin-Konzentrationen mit dem BMI, d.h. mit steigendem BMI nahm auch die Serumkonzentration des Adipokins zu. Bei den Psoriatikern gab es keine solche Korrelation. Hier verteilten sich die Messpunkte U-förmig mit hohen Vaspin-Konzentrationen im Bereich des Normalgewichts (BMI <25).

Für den Nachweis von Vaspin in Hautbiopsaten auf mRNA Ebene wurde zunächst ein Vaspin-Standard angefertigt. Weiterhin konnte erfolgreich ein optimiertes Protokoll für die Amplifikation der Vaspin-Zielsequenz in der real time PCR etabliert werden, welches den Nachweis des Adipokins in allen Hautbiopsaten ermöglichte.

Auf Proteinebene konnte Vaspin mit der Immunhistochemie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers erstmals sowohl in Schnittpräparaten gesunder Haut als auch psoriatischer Haut nachgewiesen werden. Eine positive Reaktion war in der Epidermis und dem subkutanen Fettgewebe zu verzeichnen. In den Schnittpräparaten psoriatischer Läsionen war der Antikörper gleichmäßig über die Epidermis verteilt, während in der gesunden Haut eine stärkere Konzentration im Stratum granulosum zu verzeichnen war. Damit wurden erstmals Keratinozyten als Quelle des Proteins Vaspin identifiziert. Auf Grund des massiven Vorkommens in der Epidermis wurde auf eine Rolle von Vaspin in der Regulation der komplexen Balance zwischen verschiedenen Proteasen und deren Inhibitoren in der Haut, welche im Desquamationsprozess aktiv sind, geschlossen.

Vaspin zeigte in der Zellkultur keinen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu DCs. Sowohl die durchflusszytometrisch ermittelte Expression der Oberflächenmoleküle als auch die durch ELISA bestimmte Zytokinsekretion war im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Während des Reifungsprozesses der DCs unter LPS Stimulation konnte unter Zugabe von Vaspin ebenfalls durchflusszytometrisch keine signifikante Änderung des Phänotyps im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. In die Untersuchungen waren die Oberflächenmoleküle CD14 als charakteristischer Marker für Monozyten, CD1a als Marker für die Differenzierung zu DCs, MHCII sowie die Reifemarker CD80, CD83 und CD86 einbezogen. Auch die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 sowie TNF α waren unter Vaspin-Einfluss, bezogen auf die Kontrolle, nicht signifikant verändert. Somit zeigte Vaspin in den *in vitro* Zellkulturen unter den gewählten Bedingungen keinen Effekt.

6. Literaturverzeichnis

- AGGARWAL S, GHILARDI N, XIE MH, DE SAUVAGE FJ, GURNEY AL **(2003)** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278: 1910-4
- ALBANESI C, DE PITA O, GIROLOMONI G **(2007)** Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenic functions of keratinocytes. *Clinics in Dermatology*, 25: 581-588
- ASADULLAH K, STERRY W, VOLK HD **(2003)** Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* 55: 241-269
- AZFAR RS & GELFAND JM **(2008)** Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Current Opinion in Rheumatology*, 20: 416-422
- BAKER BS, FRY L **(1992)** The immunology of psoriasis. *Br J Dermatol*, 126(1): 1-9
- BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K **(2000)** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18: 767-811
- BOEHNCKE W-H & ZOLLNER TM **(1999)** Die Rolle bakterieller Superantigene in der Pathophysiologie der Haut. *Hautarzt*, 50: 91-97
- BOEHNCKE W-H, BUERGER C, BOEHNCKE S **(2009)** Komorbiditäten bei Psoriasis vulgaris. *Der Hautarzt*, 2: 116-121
- BORGOÑO CA & DIAMANDIS EP **(2004)** The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4: 876-890
- BORGOÑO CA, MICHAEL IP, KOMATSU N, JAYAKUMAR A, KAPADIA R, CLAYMAN GL, SOTIROPOULOU G AND DIAMANDIS EP **(2007)** A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem*, 282(6): 3640-3652
- BOYMAN O, HEFTI HP, CONRAD C, NICKOLOFF BJ, SUTER M, NESTLE FO **(2004)** Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor- α . *J Exp Med* 2004,199: 731-736
- BOWCOCK AM & KRUEGER JG **(2005)** Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews Immunology*, 5: 699-711
- BRATTSAND M, STEFANSSON K, LUNDH C, HAASUM Y, EGELRUD T **(2005)** A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J invest Dermatol*, 124: 198-203
- BRATTSAND M, STEFANSSON K, HUBICHE T, NILSSON SK, EGELRUD T **(2009)** SPINK9: A selective, skin-specific kazal-type serine protease inhibitor. *J Invest Dermatol*, 129: 1656-1665
- BUSTIN SA **(2000)** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25: 169-193
- CAMINOS JE, BRAVO SB, GRACES MF, GONZALEZ CR, CEPEDA LA, GONZALEZ AC, NOGUEIRAS R, GALLEGU R, GARCIA-CABALLERO T, CORDIDO F, LOPEZ M, DIEGUEZ C **(2009)** Vaspilin and amyelin are expressed in human and rat placenta and regulated by nutritional status. *Histol Histopathol*, 24: 979-990
- CAUBET C, JONCA N, BRATTSAND M, GUERRIN M, BERNARD D, SCHMIDT R, EGELRUD T, SIMON M, SERRE G **(2004)** Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol*, 122: 1235-1244
- CONNELLY, OM **(2001)** Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20(5): 389S-395S
- CORK MJ, DANBY SG, VASILOPOULOS Y, HADGRAFT J, LANE ME, MOUSTAFA M, GUY RH, MACGOWAN AL, TAZI-AHNINI R, WARD SJ **(2009)** Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129: 1892-1908

- CROWELL JA, STEELE VE AND FAY JR **(2007)** Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol. Cancer. Ther.*, 6: 2139-2148
- DEBELA M, HESS P, MAGDOLEN V, SCHECHTER NM, STEINER T, HUBER R, BODE W, GOETTIG P **(2007)** Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *PNAS*, 104(41): 16086-16091
- DERAISON C, BONNART C, LOPEZ F, BESSON C, ROBINSON R, JAYAKUMAR A, WAGBERG F, BRATTSAND M, HACHEM JP, LEONARDSSON G, HOVNANIAN A **(2007)** LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Molecular Biology of the Cell*, 18: 3607-3619
- DE SAINT-VIS, B ET AL. **(1998)** The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol*, 160: 1666-76
- DI CESARE A, DI MEGLIO P, NESTLE FO **(2009)** The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 129: 1339-1350
- DING L **(1992)** IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol*, 148: 3133-39
- EL-DAROUTI M & HAY RA **(2010)** Psoriasis: Highlights on Pathogenesis, Adjuvant Therapy and Treatment of Resistant Problematic Cases (Part I). *J Egypt Women Dermatol Soc.*, 7(2):64-70
- ELDER JT, HAMMERBERG C, COOPER KD, KOJIMA T, NAIR RP, ELLIS CN, VOORHEES JJ **(1993)** Cyclosporin A rapidly inhibits epidermal cytokine expression in psoriasis lesions, but not in cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 101(6): 761-6
- ELDER JT. **(2009)** Genome-wide Association Scan Yields New Insights into the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Genes Immun.*, 10(3): 201-209
- ELLIS CN, GORSULOWSKY DC, HAMILTON TA, BILLINGS JK, BROWN MD, HEADINGTON JT, COOPER KD, BAADSGAARD O, DUELL EA, ANNESLEY TM. **(1986)** Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA*. 256(22):3110-6
- ELLIS CN, FRADIN MS, MESSANA JM, BROWN MD, SIEGEL MT, HARTLEY AH, ROCHER LL, WHEELER S, HAMILTON TA, PARISH TG, ET AL. **(1991)** Cyclosporine for plaque-type psoriasis. Results of a multidose, double-blind trial. *N Engl J Med*. 324(5): 277-8
- FREEMAN WM, WALKER SJ, AND VRANA KE. **(1999)** Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26: 112-125
- FU B-D, YAMAWAKI H, OKADA M, HARA Y **(2009)** Vaspin can not inhibit TNF- α -induced inflammation of human umbilical vein endothelial cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 71(9): 1201-1207
- GAN L, LEE I, SMITH R, ARGONZA-BARRETT R, LEI H, MCCUAIG J, MOSS P, PAEPER B, WANG K **(2000)** Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene*, 257(1): 119-130
- GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, DECALLONNE B, BOUILLON R, AND MATHIEU C **(2001)**. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401
- GOGOLAK P, RETHI B, SZATMARI I, LANYI A, DEZSO B, NAGY L, RAJNAVOLGYI E **(2007)** Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Blood*, 109(2): 643-652
- GONZALEZ CR, CAMINOS JE, VAZQUEZ MJ, GARCES MF, CEPEDA LA, ANGEL A, GONZALEZ AC, GARCIA-RENDUELES ME, SANGIAO-ALVARELLOS S., LOPEZ M, BRAVO SB, NOGUEIRAS R, AND DIEGUEZ C **(2009)** Regulation of visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor by nutritional status, metformin, gender and pituitary factors in rat white adipose tissue. *J Physiol.*, 587(14): 3741–3750

- GOTTLIEB SL, GILLEAUDEAU P, JOHNSON R, ESTES L, WOODWORTH TG, GOTTLIEB AB, KRUEGER JG **(1995)** Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med.* 1(5): 442-7
- GOTTLIEB AB, DANN F **(2009)** Comorbidities in Patients with Psoriasis. *The American Journal of Medicine*, 122: 1150e1-1150e9
- GRAKOUI A, BROMLEY SK, SUMEN C, DAVIS MM, SHAW AS, ALLEN PM, AND DUSTIN ML **(1999)** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285: 221-227
- GU Y, YANG J, OUYANG X, LIU W, LI H, YANG J, BROMBERG J, CHEN SH, MAYER L, UNKELESS JC, XIONG H **(2008)** Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol.*, 38(7): 1807-13.
- GUILHOU JJ, MEYNADIER J., CLOT J **(1978)** New concepts in the Pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol*, 98: 585-592
- HARDER J, SCHRÖDER JM **(2005)** Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol.* 2005 77(4): 476-86
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, AND WILLIAMS PM **(1996)** Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6:986-993
- HIDA K, WADA J, EGUCHI J, ZHANG H, BABA M, SEIDA A, HASHIMOTO I, OKADA T, YASUHARA A, NAKATSUKA A, SHIKATA K, HOURAI S, FUTAMI J, WATANABE E, MATSUKI Y, HIRAMATSU R, AKAGI S, MAKINO H, KANWAR YS **(2005)** Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(30):10610-5
- IRVING JA, PIKE RN, LESK AM, WHISSTOCK JC **(2000)** Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 10(12): 1845-64
- JARIWALA SP **(2007)** The role of dendritic cells in the immunopathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 299: 359–366
- JEFFES EW 3RD, WEINSTEIN GD **(1995)** Methotrexate and other chemotherapeutic agents used to treat psoriasis. *Dermatol Clin.* 13(4): 875-90.
- JEONG E, YOUN B-S, KIM DW, KIM EH, PARK JW, NAMKOONG C, JEONG JY, YOON S, PARK JY, LEE K-U, AND KIM M-S **(2010)** Circadian Rhythm of Serum Vaspin in Healthy Male Volunteers: Relation to Meals. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(4): 1869–1875
- KARASTERGIOU K & MOHAMMED-ALI V **(2010)** The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (1-2): 69-78
- KAUFFMAN CL, ARIA N, TOICHI E, MCCORMICK TS, COOPER KD, GOTTLIEB AB, EVERITT DE, FREDERICK B, ZHU Y, GRAHAM MA ET AL **(2004)** A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 123: 1037-1044
- KAUFMANN C **(2005)** Multiple Sklerose: Attacke auf die eigenen Nervenzellen. Universität Zürich, 19. Mai 2005
- KELLEHER M & BEVERLEY PCL **(2001)** Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naïve polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *Journal of Immunology*, 167: 6247-6255
- KIM KS, NGUYEN PHAM TN, JIN C-J, UMEYAMA A, SHOJI N, HASHIMOTO T, LEE J-J AND TAKEI M **(2011)** Uncarinic Acid C Isolated from *Uncaria rhynchophylla* Induces Differentiation of Th1-Promoting Dendritic Cells Through TLR4 Signaling. *Biomarker Insights*, 6: 27–38

- KRUEGER JG **(2002)** The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol*. 46(1): 1-23
- KRUEGER G, ELLIS CN **(2005)** Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, 53: 94-100
- KRUEGER JG., BOWCOCK A. **(2005)**, Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*, 564: 30-36
- KRYCZEK I, BRUCE AT, GUDJONSSON JE, JOHNSTON A, VATAN L, SZELIGA W ET AL. **(2008)** Induction of memory IL-17+ T cell trafficking and expansion by IFN-gamma: Mechanism and pathological relevance. *Journal of Immunology*, 181: 4733-4741
- KUSHNER, I. & MACKIEWICZ, A **(1993)** The acute-phase response: an overview. In: Acute-Phase Proteins Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications (Mackiewicz, A., Kushner, I. & Baumann, H., eds.), pp. 3–19. CRC Press, Boca Raton, FL.
- LAGO F, GOMEZ R, GOMEZ-REINO J, DIEGUEZ C AND GUALILLO O **(2009)** Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Science*, 34(10): 500-510
- LAGO F, DIEGUEZ C, GÓMEZ-REINO J, GUALILLO O **(2007)** Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature clinical practice rheumatology*, 3(12): 716-724
- LANGENKAMP A, MESSI A, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F **(2000)** Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1: 311-316
- LAW RH, ZHANG Q, MCGOWAN S, BUCKLE AM, SILVERMAN GA, WONG W, ROSADO CJ, LANGENDORF CG, PIKE RN, BIRD PI, WHISSTOCK JC **(2006)** An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.*, 7(5): 216
- LEBWOHL M **(2003)** Psoriasis. *Lancet*, 361: 1197-204
- LEE SE, JEONG SK, LEE SH **(2010)** Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *YONSEI MED J*, 51: 808-822
- LEW W, BOWCOCK AM & KRUEGER JG **(2004)** Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol*, 25: 295-305
- LI W, DANILENKO DM, BUNTING S, GANESAN R, SA S, FERRANDO R, WU TD, KOLUMAM GA, OUYANG W, KIRCHHOFFER D **(2009)** The serine protease Marapsin is expressed in stratified squamous epithelia and is up-regulated in the hyperproliferative epidermis of psoriasis and regenerating wounds. *J Biol Chem*, 284(1): 218-228
- LOCKEY C, OTTO E, LONG Z **(1998)** Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, 24: 744-746
- LOWES MA, BOWCOCK AM & KRUEGER JG **(2007)** Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130): 866-73
- MANGAN MSJ, KAISERMAN D & BIRD PI **(2008)** The role of serpins in vertebrate immunity. *Tissue antigens*, 72: 1-10
- MCKENZIE S, SAKAMOTO S, KYPRIANOU N **(2008)** Maspin modulates prostate cancer cell apoptotic and angiogenic response to hypoxia via targeting AKT. *Oncogene*, 27(57): 7171-9
- MEVES A. **(2006)** Intensivkurs Dermatologie. Elsevier GmbH München
- MEYER-HOFFERT U, WU Z, SCHRÖDER J-M **(2009)** Identification of lympho-epithelial kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS ONE*, 4(2): e4372. Doi: 10.1371/journal.pone.0004372
- MROWITZ U, REICH K **(2009)** Psoriasis-neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*, 106: 11-19

- MURRAY, ML, BERGSTRESSER PR, ADAMS-HUET B, COHEN JB **(2008)** Relationship of Psoriasis severity to obesity using same-gender siblings as controls for obesity. *Clinical and Experimental Dermatology*, 34: 140-144
- NESTLE FO, CONRAD C, TUN-KYI A, HOMEY B, GOMBERT M, BOYMANO, BURG G, LIU Y-J, AND GILLIET M **(2005)** Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *JEM*, 202 (1): 135–143
- NICKOLOFF BJ, WRONE-SMITH T **(1999)** Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 155(1): 145-58
- NICKOLOFF BJ, XIN H, NESTLE FO, QIN J-Z **(2007)** The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clinics in Dermatology*, 25: 568-573
- NICKOLOFF BJ **(2007a)** Cracking the cytokine code in psoriasis. *Nat Med*, 13(3): 242-4
- OSSOVSKAYA VS AND BUNNET NW **(2004)** Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 84: 579-621
- OUCHI N, PARKER JL, LUGUS JJ AND WALSH K **(2011)** Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11: 85-97
- OZGEN M, KOCA, SS, ISIK B, GUNDOGDU B, USTUNDAG B, ISIK A **(2011)** Serum Adiponectin and Vaspin Levels in Systemic Sclerosis., *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(1): 35-42
- PICKER LJ, TERSTAPPEN LW, ROTT LS, STREETER PR, STEIN H, BUTCHER EC **(1990)** Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol*. 145(10): 3247-55
- PICKER LJ, TREER JR, FERGUSON-DARNELL B, COLLINS PA, BERGSTRESSER PR, TERSTAPPEN LW **(1993)** Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol*. 150(3): 1122-36
- PIETRZAK AT, ZALEWSKA A, CHODOROWSKA G, KRASOWSKA D, MICHALAK-STOMA A, NOCKOWSKI P, OSEMLAK P, PASZKOWSKI T, ROLINSKI JM **(2008)** Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta*, 394: 7-21
- PISKIN G, SYLVA-STEENLAND RMR, BOS JD, TEUNISSEN MBM **(2006)** In Vitro and In Situ expression of IL-23 by Keratinocytes in Healthy Skin and Psoriasis Lesions: Enhanced Expression in Psoriatic Skin. *J. Immunol.*, 176:1908-1915
- RABE K, LEHRKE M, PARHOFER KG AND BROEDL UC **(2008)** Adipokines and Insulin Resistance. *Mol Med*, 14: 741-751
- RADWAN P, RADWAN-KWIATEK K, TABARKIEWICZ J, ROLINSKI J **(2010)** Enhanced phenotypin and functional maturation of monocyte-derived dendritic cells from patients with active crohn`s disease and ulcerative colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(6): 695-703
- RANDOLPH GJ, BEAULIEU S, LEBECQUE S, STEINMAN RM, MULLER WA **(1998)** Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 282: 480-3
- RAO NV, WEHNER NG, MARSHALL BC, GRAY WR, GRAY BH, HOIDAL JR **(1991)** Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. *J Biol Chem*, 266(15): 9540-9548
- RAWER D **(2005)** Dissertation, Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie. Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- RIEDL E **(2008)** Biologika in der Therapie der Psoriasis. *facharztDERMATOLOGIE*, 4: 20-22
- ROBERT C, KUPPER TS **(1999)** Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med*. 341(24): 1817-28

- SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A **(1994)** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.*, 179(4): 1109-18
- SEEGER J, ZIEGELMEIER M, BACHMANN A, LÖSSNER U, KRATZSCH J, BÜHER M, STUMVOLL M, FASSHAUER M **(2008)** Serum levels of the adipokine vaspin in relation to metabolic and renal parameters. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 247-251
- SEGAL BM, KLINMAN DM, SHEVACH, EM **(1997)** Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *Journal of Immunology*, 158(11): 5087–5090
- SHIMIZU H, SHIMOMURA Y, NAKANISHI Y, FUTAWATARI T, OHTANI K, SATO N, MORI M. **(1997)** Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol*, 154: 285-292
- SONKOLY E, WEI T, JANSON PC, SÄÄF A, LUNDEBERG L, TENGVALL-LINDER M, NORSTEDT G, ALENIUS H, HOMEY B, SCHEYNIUS A, STÅHLE M, PIVARCSI A **(2007)** MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One*, 2(7): e610
- STABINSKY Y **(2007)** Serpine, Serpinopathien und Konformationskrankungen des Menschen. *BIOSpektrum*, 3: 287-289
- SUGIYAMA H, GYULAI R, TOICHI E, GARACZI E, SHIMADA S, STEVENS SR, MCCORMICK TS, COOPER KD. **(2005)** Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 174(1): 164-73
- TEUNISSEN MB **(1998)** Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J invest Dermatol.*, 111: 645-649
- TÖNJES A, FASSHAUER M, KRATZSCH J, STUMVOLL M, BLÜHER M **(2010)** Adipokine Pattern in Subjects with Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance in Comparison to Normal Glucose Tolerance and Diabetes. *PLoS ONE*, 5(11): e13911
- Toulza E, Mattiuzzo NR, Galliano M-F, Jonca N, Dossat C, Jacob D, de Daruvar A, Wincker P, Serre G and Guerrin M **(2007)** Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biology.*, 8(6), Article R107
- TRINCHIERI G **(1993)** Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes. *J Cell Biochem*, 53: 301-8
- TSCHACHLER E **(2007)** Psoriasis: the epidermal component. *Clinics in Dermatology*, 25: 589–595
- VICTOR FC, GOTTLIEB AB **(2002)** TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*, 1: 264-75
- VINCENT S, MARTY L AND FORT P **(1993)** S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. *Nucleic Acids Research*, 21(6), 1498
- WANG Y, WANG W, WANG L, ZHOU X **(2010)** Calorie control increased vaspin levels of serum and periepididymal adipose tissue in diet-induced obese rats in association with serum free fatty acid and tumor necrosis factor alpha. *Chin Med J*, 123(7): 936-941
- WARE CF **(2003)** The TNF Superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14: 181–184
- WOLK K, HAUGEN, HS, XU W, WITTE E, WAGGIE K, ANDERSON M, VOM BAUR E, WITTE K, WARSZAWSKA K, PHILIPP S, JOHNSON-LEGER C, VOLK H-D, STERRY W, SALBAT R **(2009)** IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-γ are not. *J Mol Med*, 87: 523-536
- WONG ML AND MEDRANO JF **(2005)** Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1): 75-85

- WOZNIAK SE, GEE LL, WACHTEL MS, FREZZA EE **(2009)** Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*,54(9): 1847-56
- WRONE-SMITH T & NICKOLOFF BJ **(1996)** Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest.* 98(8):1878-87
- YAMAWAKI H **(2011)** Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol. Pharm. Bull.*, 34(3):307-310
- YOUN BS, KLÖTING N, KRATZSCH J, LEE N, PARK JW, SONG ES, RUSCHKE K, OBERBACH A, FASSHAUER M, STUMVOLL M, BLÜHER M **(2008)** Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 57:372–377 *BioTechniques* 39:75-85
- YOUSEF GM, DIAMANDIS EP **(2002)** Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem.* 383(7-8):1045-57
- YOUSEF GM AND DIAMANDIS EP **(2003)** An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin. Biochem.* 36, 443-452
- ZEEUWEN PLJM **(2004)** Epidermal differentiation: The role of proteases and their inhibitors. *Eur. J. Cell Biol.*, 83:761-773
- ZEEUWEN PLJM, CHENG T AND SCHALKWIJK J **(2009)** The biology of Cystatin M/E and its cognate target proteases. *Journal of Investigative Dermatology*, 129:1327-1338
- ZHANG Y, Proenca R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L & FRIEDMAN JM **(1994)** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432
- ZHENG Y, DANILENKO DM, VALDEZ P, KASMAN I, EASTHAM-ANDERSON J, WU J & OUYANG W **(2007)** Interleukin-22, a Th 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445:648-651
- ZHOU LJ AND TEDDER TF **(1995)** A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood*, 86:3295-301

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die durch praktische, ideelle sowie materielle Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Simon danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die wissenschaftlichen Diskussionen sowie das beständige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt insbesondere Frau Dr. rer. nat. habil. Saalbach für die engagierte Betreuung, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die Einarbeitung in die Thematik.

Herrn Dr. rer. nat. habil. Anderegg danke ich für die Unterstützung im Bereich der molekularbiologischen experimentellen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Blüher und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Durchführung des Vaspin-ELISA sowie die bereitgestellten Referenzproben danken.

Mein Dank gilt weiter allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Hautklinik für die stete Unterstützung bei der Einarbeitung in verschiedene Arbeitstechniken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Thomas, meinen Kindern Rebecca und Lennart, meinen Eltern und Schwiegereltern sowie allen Freunden für die stets gewährte moralische Unterstützung, die nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

19.01.2012

.....
Datum

Rall

.....
Unterschrift